UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MARCELLA ROVERATO PASTORE

Função e perfil metabólico de plaquetas na infecção experimental
por *Achromobacter xylosoxidans*

Ribeirão Preto

2021

MARCELLA ROVERATO PASTORE

**Função e perfil metabólico de plaquetas na infecção experimental
por *Achromobacter xylosoxidans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
e Biotecnologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências e
Biotecnologia

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

Ribeirão Preto

2021

PASTORE
MARCELLA,
M.P.

Função e perfil metabólico de plaquetas na infecção experimental

por *Achromobacter xylosoxidans*

Espaço de **2,5 cm**
reservado para etique
de localização da
biblioteca

MESTRADO
FCFRPUSP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Pastore, Marcella

Função e perfil metabólico de plaquetas na infecção experimental por *Achromobacter xylosoxidans*. Ribeirão Preto, 2021.

89 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. *Achromobacter xylosoxidans*. 2. Plaquetas. 3. Sistema Imunológico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcella Roverato Pastore

Função e perfil metabólico de plaquetas na infecção experimental por
Achromobacter xylosoxidans

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências e
Biotecnologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

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

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia;

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Maria Elizabeth Roverato Pastore e Jefferson Marino Pastore. Vocês sempre incentivaram meus estudos, e apoiaram meus sonhos. Vocês são minha base e meu exemplo de vida.

Obrigada por tanto!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Elizabeth Roverato Pastore e Jefferson Marino Pastore, por todo amor e dedicação a mim e a minha irmã. Por sempre priorizarem e incentivarem a nossa educação. Pelo esforço em sempre nos dar conforto e segurança. Por serem meu porto-seguro em todos os momentos da minha vida. Vocês com certeza são os melhores pais que existem! Minha maior gratidão da vida é tê-los como pais. Amo muito vocês!

À minha irmã Isabella Roverato Pastore, por sempre estar ao meu lado e apoiar minhas escolhas. Além de irmã, uma amiga que eu posso contar em qualquer momento. Imensa gratidão em ter como irmã uma das minhas pessoas preferidas no mundo. Obrigada por tudo!! Te amo muito!

Ao meu companheiro de vida Ricardo Sastre Capelozza, por todo amor, carinho e apoio. Por acolher minhas escolhas e minhas versões, com muito amor. Por mostrar o lado mais otimista, e esperançoso de todas as situações. Te amo!!

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli, minha orientadora. Por me dar uma chance, me acolher em seu laboratório, e me dar todo apoio e suporte necessários. Você é um exemplo de vida, dedicação, superação e profissionalismo. Sou muito grata em ser sua aluna, e muito orgulhosa também!

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Gardinassi, meu co-orientador. Foi um privilégio ter sua co-orientação nesse trabalho. Aprendi muito com você! Obrigada pela paciência, dedicação e suporte. Você é um excelente profissional e eu tenho muito orgulho em ter sido sua aluna!

À Me. Camila de Oliveira Silva e Souza, por sua colaboração nesse trabalho. Por me incentivar a ser melhor a cada dia, e a superar minhas inseguranças. Você é um exemplo de pesquisadora e aluna, que vou levar comigo sempre! Obrigada por sua amizade e apoio nos momentos em que mais precisei! E também pelos momentos felizes e divertidos dentro e fora do laboratório.

Ao Me. Jefferson Elias, por sua colaboração e amizade. Por me acolher no “time da *Achromobacter*” e me ensinar tudo sobre ela. Você foi um presente na

minha vida! Esteve comigo em todas as etapas desse projeto, e em todas as minhas versões durante ele. Você foi uma alegria nos meus dias! Obrigada pela parceria na bancada e na vida!

Aos meus queridos amigos Felipe, Luana, Ricardo e Tanize por todo apoio e ajuda, dentro e fora do laboratório. Com vocês meus dias ficaram mais leves e alegres! Obrigada pela amizade e acolhimento. Vocês são incríveis! Presentes de Ribeirão!

Aos meus amigos do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses), Morgana Prado, Alyne Fávero, Carol Fontanari, Camila de Oliveira, Luiz G. Gardinassi, Mouzarlem, Tanize, Vinícius, Luana Macedo, Jefferson Elias, Marcella Nicolini, Grazielle Gaia, Amanda, Viviane e Carlos. Obrigada por toda vivência, alegrias e aprendizado!

Aos meus amigos do LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), Prof^a. Dr^a. Fabiani Gai Frantz, Ricardo Castro, Felipe Lima, Cícero Almeida, Fabiana Zambuzi, Fabrícia Sugiyama, Patrick Fernandes. Obrigada pela convivência e bons momentos!

À equipe técnica Alyne Fávero, Carol Fontanari, Viviane Nardini, Carlos Sorgi e Fabiana Rosseto. Obrigada pela paciência, ajuda e disponibilidade! Vocês foram fundamentais para execução desse projeto!

À Profa. Dra Ana Lúcia da Costa Darini pela doação da cepa de *A. xylosoxidans* utilizada neste trabalho.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, Ana Lúcia, por toda ajuda e disponibilidade. Obrigada por ser tão doce, se preocupar e nos acolher tão bem!

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia por toda formação e suporte!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só tem uma chance
de fazer aquilo que quer

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce
dificuldade para fazê-la forte
tristeza para fazê-la humana
e esperança suficiente para fazê-la feliz...”

Clarice Lispector

RESUMO

RESUMO

PASTORE, M. R. **Função e perfil metabólico de plaquetas na infecção experimental por *Achromobacter xylosoxidans***. 2021. 89 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

As plaquetas são elementos anucleados do sangue que têm papel considerável na modulação da hemostasia. Estudos recentes indicam que as plaquetas são reguladores essenciais do sistema imunológico e apresentam um papel fundamental nas infecções. As plaquetas armazenam grandes quantidades de moléculas que promovem a eliminação direta do patógeno ou modulam as atividades efectoras dos leucócitos. *Achromobacter xylosoxidans* são normalmente encontrados no meio ambiente e são patógenos oportunistas, infectando principalmente pessoas com fibrose cística (FC), tumores e imunodeficiências. O objetivo deste estudo foi investigar o papel das plaquetas na resposta imune contra *A. xylosoxidans*. Para tal, investigamos o perfil de ativação de plaquetas incubadas com *A. xylosoxidans* quantificando a expressão da P-selectina (CD62P) por meio de citometria de fluxo. Observamos que tanto a porcentagem de plaquetas que expressaram P-selectina quanto a média da intensidade de fluorescência de CD62P foram significativamente maiores após incubação com *A. xylosoxidans*, demonstrando que as plaquetas são ativadas por este bacilo. Também avaliamos a atividade microbica das plaquetas após incubação das mesmas com *A. xylosoxidans*. Para tanto, plaquetas isoladas de sangue periférico de humanos voluntários saudáveis, foram incubadas por 10 minutos, 2, 4 e 8 horas com 10^6 bactérias, a 37°C, 5% de CO₂. Após estes períodos, as suspensões de bactérias foram então semeadas em BHI-ágar para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU). Observamos que as plaquetas de todos os voluntários inibiram o crescimento bacteriano entre 10% a 85%, sendo a atividade microbica maior após 4h e 8h de incubação. Nossos dados, demonstram que as plaquetas humanas apresentam diretamente atividade microbica e/ou bacteriostática de *A. xylosoxidans*. Por fim, avaliamos as alterações metabólicas decorrentes da interação entre plaquetas e bactérias. Para tanto, utilizamos a espectrometria de massa de alta resolução acoplada à cromatografia líquida, tecnologia de ponta na área de metabolômica e biologia de sistemas. Os dados foram analisados por meio de programas de biologia computacional projetados especificamente para análises estatísticas e funcionais. Nossos resultados demonstraram que *A. xylosoxidans* contribui para o distúrbio de diferentes vias metabólicas em plaquetas humanas, como metabolismo de ácidos graxos, pirimidina e xenobióticos. Esses resultados demonstram que *A. xylosoxidans* ativa plaquetas, que também apresentam atividade antimicrobiana significativa quando expostas a essa bactéria. Além disso, *A. xylosoxidans* causa alterações no perfil metabólico das plaquetas.

Palavras-chave: plaquetas, sistema imune, bactéria, metaboloma

ABSTRACT

ABSTRACT

PASTORE, M. R. **Function and metabolic profile of platelets on the experimental infection by *Achromobacter xylosoxidans***. 2021. 89 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Platelets are anucleate blood elements that have considerable role in modulating hemostasis. Recent studies indicate that platelets are essential regulators of the immune system and exhibit a fundamental role in infections. Platelets store high amounts of molecules that promote direct pathogen elimination or modulate effector activities of leukocytes. *Achromobacter xylosoxidans* are normally found in the environment and are opportunistic pathogens, infecting mostly persons with cystic fibrosis (CF), tumors and immunodeficiencies. The aim of this study was to investigate the role of platelets in the immune response against *A. xylosoxidans*. For this purpose, we investigated the activation profile of platelets incubated with *A. xylosoxidans* by quantifying the expression of P-selectin (CD62P) by flow cytometry. We observed that both the percentage of platelets that expressed P-selectin and the mean fluorescence intensity of CD62P were significantly higher after incubation with *A. xylosoxidans*, demonstrating that platelets are activated by this bacillus. We also evaluated the microbicidal activity of platelets after incubating them with *A. xylosoxidans*. For this, platelets isolated from peripheral blood from healthy human volunteers were incubated for 10 minutes, 2, 4 and 8 hours with 10^6 bacteria, at 37 ° C, 5% CO₂. After these periods, the bacterial suspensions were then seeded on BHI-agar to count Colony Forming Units (CFU). We observed that the platelets of all volunteers inhibited bacterial growth by 10% to 85%, with greater microbicidal activity after 4 and 8 hours of incubation. Our data demonstrate that human platelets directly show *A. xylosoxidans* microbicidal and / or bacteriostatic activity. Lastly, we evaluated metabolic alterations resulting from interaction between platelets and bacteria. For this purpose, we used high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography, a state-of-art technology on the field of metabolomics and systems biology. The data were analyzed using computational biology programs specifically designed for statistical analysis and functional analysis. Our results demonstrated that *A. xylosoxidans* contribute to the disturbance of different metabolic pathways in human platelets, like metabolism of fatty acids, pyrimidine and xenobiotics. These results demonstrate that *A. xylosoxidans* activate platelets, which also exhibit significant antimicrobial activity when exposed to these bacteria. Also, *A. xylosoxidans* cause alterations in platelet metabolic profile.

Keywords: platelets, immune system, bacteria, metabolome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia de plaquetas ativadas.....	35
Figura 2. Plaquetas e o Sistema Imune.....	39
Figura 3. Esquema das análises “- ômicas” possíveis a ser aplicadas em plaquetas.....	40
Figura 4. Padronização do número de plaquetas e MOI de incubação com <i>A. xylosoxidans</i>	51
Figura 5. Padronização do ensaio de atividade microbicida.....	53
Figura 6. Finalização da padronização do ensaio de atividade microbicida.....	54
Figura 7. Padronização da expressão de P selectina por plaquetas.....	55
Figura 8. Estratégia de <i>gating</i> da marcação de plaquetas.....	58
Figura 9. Expressão variada de CD62P após estímulo com <i>A. xylosoxisans</i>	59
Figura 10. Plaquetas são ativadas na presença de <i>A. xylosoxisans</i>	60
Figura 11. Plaquetas apresentam formação de pseudópodes após contato com <i>A. xylosoxidans</i>	61
Figura 12. Plaquetas inibem o crescimento de <i>A. xylosoxidans</i> , após 8 horas.....	63
Figura 13. Plaquetas inibem o crescimento de <i>A. xylosoxidans</i>	64
Figura 14. Perfil metabólico de <i>A. xylosoxidans</i>	66
Figura 15. Perfil metabólico das plaquetas é alterado na presença da <i>A. xylosoxidans</i>	67
Figura 16. Dinâmica da abundância diferencial de matabólitos após estímulo com <i>A. xylosoxidans</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CCL5/RANTES	Ligante 5 de CC quimiocina/ <i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
CD62-P	P-selectina
CE-MS	Eletroforese capilar associada a espectrometria de massas
CXCL1/GRO- α	Ligante 1 de CXC quimiocina/proteína α reguladora de crescimento
CXCL4/PF4	Ligante 4 de quimiocina CXC/fator plaquetário 4
CXCL5	Ligante 5 de CXC quimiocina
CXCL7/NAP-2	Ligante 7 de CXC quimiocina/ proteína ativadora de neutrófilo 2
CXCL8/IL8	Ligante 8 de CXC quimiocina/ interleucina-8
DC	Célula dendrítica
D.O	Densidade óptica
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ECGF	Fator de crescimento celular
EGF	Fator de crescimento epidêmico
Fator III	Fator de coagulação III
Fator V	Fator de coagulação V
Fator VIII	Fator de coagulação VIII
FC	Fibrose cística
FvW	Fator von Willebrand
GC-MS	Cromatografia Gasosa associada a espectrometria de massas
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GP	Glicoproteína
GP Ia / IIa	Glicoproteína Ia/IIa ou integrina $\alpha_2\beta_2$
GP Ib / V / IX	Glicoproteína Ib / V / IX
GP IIb / IIIa	Glicoproteína IIb / IIIa
GP VI	Glicoproteína VI
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1 β	Interleucina 1 β

IL-6	Interleucina 6
LAMP-1	Proteínas de membrana lisossomal 1
LAMP-2	Proteínas de membrana lisossomal 2
LPS	Lipopolissacarídeo
LS -MS	Cromatografia líquida associada a espectrometria de massas
LTB ₄	Leucotrienos
LTs	Leucotrienos
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MKs	Megacariócitos
mRNAs	RNAs mensageiros
miRNAs	MicroRNAs
MS	Espectrometria de Massas
OCS	Sistema Canalicular Aberto
OL	Lipídeo contendo ornitina
PAI 1	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PI-1	Inibidor 1 da protease
PIXI	Inibidor de plaquetas do fator XI
PDCI	Inibidor de collagenase derivado de plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLT	Plaqueta
PRP	Plasma rico em plaquetas
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
PSGL-1/CD162	Proteína ligante 1 de P-selectina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR2	Receptor do tipo <i>Toll</i> 2

TLR4	Receptor do tipo <i>Toll</i> 4
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	27
1.1 <i>Achromobacter xylosoxidans</i> : relevância clínica	27
1.2 <i>Achromobacter xylosoxidans</i> : Resposta Imune	28
1.3 Plaquetas: Origem e Estrutura	30
1.4 Ativação Plaquetária.....	33
1.5 Papel das plaquetas na inflamação.....	35
1.6 Metabolômica e metabolismo de plaqueta	39
2. OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Linhagem bacteriana.....	47
3.2 Considerações éticas e voluntários.....	47
3.3 Isolamento de plaquetas	47
3.4 Ensaios de <i>killing</i> e contagem de CFU	48
3.5 Citometria de fluxo	48
3.6 Microscopia confocal.....	49
3.7 Análises de metabolômica empregando HRLC-MS.....	49
3.8 Padronização	50
3.8.1 Padronização ensaios de <i>killing</i>	50
3.8.2 Padronização da expressão de P selectina por plaquetas	54
3.9 Análises estatísticas.....	55
4 RESULTADOS	57
4.1 As plaquetas são ativadas na presença da <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	57
4.2 As plaquetas apresentam mudança morfológicas em contato com <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	60
4.3 As plaquetas tem efeito microbicida contra <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	61
4.4 Perfil metabólico das plaquetas é alterado na presença da <i>A. xylosoxidans</i>	64

4.5 Dinâmica da resposta metabólica das plaquetas estimuladas com *A. xylosoxidans*...67

5 DISCUSSÃO70

6. CONCLUSÃO77

REFERÊNCIAS78

ANEXOErro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 *Achromobacter xylosoxidans*: relevância clínica

Achromobacter xylosoxidans foi descrita em 1970, por Yabuushi e Ohyama na secreção purulenta de pacientes com quadro de otite crônica. Inicialmente o gênero foi nomeado *Achromobacter*, mas em 1984 foi realocado no gênero *Alcaligenes*. No entanto, em 1998 Yabuushi e Ohyama com base nos resultados de análises filogenéticas das sequências de nucleotídeos e da diferença no conteúdo de DNA, demonstraram que *Achromobacter xylosoxidans* pertence ao gênero *Achromobacter* e não *Alcaligenes*. Trata-se de um bacilo Gram-negativo ubíquo, oxidase-positivo e não fermentador de lactose. Apesar de classificados como organismos aeróbicos, podem sobreviver em ambientes anaeróbicos. Membros do gênero *Achromobacter* apresentam flagelos peritríquios que permitem eficiente motilidade aquática. Esses organismos tem preferência por ambiente úmido ou aquoso e são comumente encontrados em abastecimento de água hospitalar e doméstico (Amoureux et al., 2013; Duggan et al., 1990; Swenson and Sadikot, 2015).

A.xylosoxidans é considerada uma bactéria oportunista e pode causar doenças em adultos com comorbidades e em neonatos. Casos de infecções por *A. xylosoxidans* foram documentados afetando uma ampla faixa de idades dos pacientes entre 3 dias a 87 anos (Claasen et al., 2011). Os problemas médicos predisponentes mais comuns observados no contexto da infecção por *A. xylosoxidans* são tumores malignos, tanto hematológicos quanto em órgão sólidos (30%), doença cardíaca (21%), imunossupressão (27%) (Gomez-Cerezo et al., 2013; Legrand et al.,1992; Claasen et al., 2011). Fibrose cística e Diabetes mellitus também são predisposições de pacientes com infecções respiratórias por *A. xylosoxidans* (Swenson and Sadikot, 2015). As síndromes clínicas decorrentes da infecção por essa bactéria são diversas, e podem ocorrer como pneumonia, bacteremia, infecções no trato urinário, infecções gastrointestinais, endocardite, meningite e doença oftálmica (Derber et al., 2011; Gómez-Cerezo et al., 2003; Reddy et al., 2009; Swenson and Sadikot, 2015).

O tratamento de pacientes com bacteremia por *A. xylosoxidans* é desafiador devido ao fato de que esse microrganismo possui mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência, frequentemente conferindo um fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Além da produção de proteínas de ligação a b-lactamases e penicilina, muitas cepas clínicas de *A. xylosoxidans* contêm genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que conferem resistência à tobramicina e gentamicina (Bador et al., 2013). Outras cepas produzem carbapenemases, que resulta em sensibilidades variáveis a agentes, como imipenem e meropenem. Além da produção de enzimas e proteínas de ligação, o *A. xylosoxidans* emprega uma série complexa de bombas de efluxo ativo. Essas bombas do tipo resistência-nodulação-divisão celular, como o AxyABM e o AxyXY-OprZ, permitem que a célula extrude vários antibióticos. (Bador et al., 2013; Swenson and Sadikot, 2015).

1.2 *Achromobacter xylosoxidans*: Resposta Imune

Similarmente a outras bactérias gram-negativas, *A. xylosoxidans* contém em sua membrana externa alta quantidade de lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina essencial para o crescimento e sobrevivência da bactéria (Okuda et al., 2016.) O LPS é composto pelo antígeno O, um oligossacarídeo central e um lipídio, denominado lipídio A (Steimle et al 2016). Esse, responsável pela toxicidade e imunomodulação da toxina. Também, é um potente ativador do sistema imune, interagindo assim com vários tipos de células hospedeiras, como mononucleares, endoteliais, granulócitos e trombócitos (Alexander et al., 2001). Por exemplo, macrófagos estimulados com LPS produzem mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio (ROS) e peptídeos (Hutchison et al., 2000). Foi demonstrado que LPS isolado do escarro de pacientes colonizados por *A. xylosoxidans*, induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-6) e IL-8, tanto no sangue total quanto em macrófagos de linhagem (Hansen et al., 2009).

Além do LPS, a parede celular dessa bactéria é composta por um composto anfipático e similar estruturalmente ao LPS, denominado lipídio

contendo ornitina (OL). OL sintetizada por *A. xylosoxidans* foi capaz de estimular a produção de mediadores inflamatórios como Prostaglandina E2 (PGE₂) e interleucina-1 β (IL-1 β) de macrófagos peritoneais de murinos (Kawaii et. al. 1998). Foi demonstrado, que macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 estimulados com OL secretaram também PGE₂, IL-1 β e TNF- α (Kawaii et. al. 2000).

Outro fator de virulência comum em espécies de *Achromobacter* é o polissacarídeo capsular Vi (ou antígeno Vi). Essa estrutura é encontrada na superfície celular bacteriana e tem como principais funções: prevenir a dessecação, facilitar a aderência (permitindo a colonização em superfícies orais), resistência a resposta imune não específica e específica (Roberts 1996). Seu papel é bem descrito na virulência da *Salmonella enterica* serovar *typhi* (*S. typhi*), e foi demonstrado que antígeno Vi aumenta a resistência a antibióticos, previne a morte do patógeno pelo sistema complemento e por fagócitos (Hu et. al. 2016).

A resposta inflamatória induzida por *A. xylosoxidans* em pacientes com Fibrose Cística (FC) é similar a resposta por *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*. Todas levaram a altos níveis séricos de IL-6, TNF- α e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), em pacientes com FC quando comparados a controles saudáveis. Além disso, pacientes colonizados por *A. xylosoxidans* apresentaram em amostras de escarros, concentrações maiores de TNF- α quando comparado a outros pacientes cronicamente infectados (Hansen et. al. 2009). Também, Hyodo e colaboradores demonstraram que camundongos imunossuprimidos são mais afetados pela infecção intravenosa de *A. xylosoxidans*, apresentando infecção crônica nos rins, baço, pulmão e coração. Também já se sabe que a maioria dos sobreviventes produziram anticorpos anti *A. xylosoxidans* e tornaram-se mais resistentes a segunda infecção com inóculo letal da bactéria (Hyodo et al., 1982).

Recentemente, nosso grupo caracterizou um modelo animal de infecção pulmonar aguda por *A. xylosoxidans* utilizando camundongos da linhagem 129sv (Prado et al., 2017). Neste trabalho, também foi avaliado os efeitos da deficiência da enzima 5-lipoxygenase (*Allox5^{-/-}*), que catalisa a conversão de ácido araquidônico nos mediadores lipídicos denominados leucotrienos (LTs).

Observamos que a infecção de camundongos 129sv induziu recrutamento significativo de neutrófilos, formação de edema e produção de TNF- α , MIP-1 α , IL-1 α , MCP-1, LTB₄, PGE₂ e α -defensina-1 nos pulmões. Camundongos 129sv sobreviveram além do 8º dia pós-infecção, enquanto animais *Alox5^{-/-}* sucumbiram a infecção até o 7º dia. Neste estudo, demonstramos que LTB₄ é um mediador crucial para recrutamento eficiente de neutrófilos nos momentos iniciais da infecção e induz a expressão do peptídeo antimicrobiano α -defensina-1 por macrófagos, que possui efeito citotóxico contra *A. xylosoxidans* (Prado et al., 2017).

1.3 Plaquetas: Origem e Estrutura

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados, esféricos com aproximadamente 2-4 μ m. Existem um trilhão delas circulantes na corrente sanguínea de um adulto humano, com tempo de vida de aproximadamente 8 a 10 dias. Para que o número normal de plaquetas (150 a 400 x 10⁹ por litro de sangue) seja mantido, 100 bilhões de plaquetas são produzidas diariamente a partir do citoplasma de megacariócitos da medula óssea (Kaushansky et. al. 2006) e do pulmão (Lefrançais et al., 2017).

A contribuição dos pulmões para a biogênese de plaquetas é substancial, representando aproximadamente 50% da produção total de plaquetas ou 10 milhões de plaquetas por hora. Além disso, megacariócitos (MKs) maduros e imaturos e progenitores hematopoiéticos nos pulmões podem migrar para a medula óssea e reconstituir completamente as contagens de plaquetas do sangue em casos de trombocitopenia (Lefrançais et al., 2017). Para formar e liberar plaquetas, MKs se tornam poliploides por meio de endomitose (replicação de DNA sem que haja divisão celular), progredindo para o processo de maturação no qual seu conteúdo citoplasmático é empacotado em múltiplas extensões longas denominadas pro-plaquetas (Machlus e Italiano, 2013). Estas extensões formam um complexo para montagem e produção de plaquetas. No decorrer de seu desenvolvimento, plaquetas recebem seus grânulos e organelas por meio do fluxo contínuo de partículas individuais transportadas do interior dos MKs (Italiano et al., 1999).

A formação de plaquetas pode ser dividida em 2 fases: a primeira fase de maturação e desenvolvimento de MKs, ocorre durante dias e requer fatores de crescimento específicos para MK (Machlus; Italiano, 2013). Nesta fase, ocorre proliferação nuclear massiva e aumento do diâmetro e volume citoplasmático de MKs, o qual é preenchido com proteínas do citoesqueleto, grânulos específicos de plaquetas, mRNAs e maquinaria de tradução, miRNAs, enzimas e metabólitos relacionados, e membrana suficiente para completar o processo de formação de plaquetas. A segunda fase é relativamente rápida e pode ocorrer em horas. Durante esta fase, as pro-plaquetas se estendem por junções no endotélio dos vasos sanguíneos, onde são liberadas para a circulação, sofrem fragmentação e originam as plaquetas discoides (Semple et al., 2011).

A estrutura das plaquetas em repouso é dividida conceitualmente em zona periférica, zona sol-gel, sistema de membranas e zona das organelas. A primeira, responsável pela adesão e agregação, consiste na membrana e suas invaginações, as quais formam o sistema canalicular aberto (OCS, do inglês *Open Canalicular System*) (White 2007). Por causa desse sistema, as plaquetas não apenas têm uma enorme área de superfície, mas podem facilmente absorver proteínas e moléculas e, liberá-las quando ativadas. A camada mais externa da membrana é rica em glicocálice e glicoproteínas, que em sua maioria são receptores para interação célula-célula e célula-vaso (Spencer e Becker, 1997). Nessa zona, também estão as bombas de cátions e ânions, fatores de coagulação V, VIII, XI e XII, integrinas e outras moléculas biologicamente ativas adsorvidas (Rendu e Brohard-Bohn, 2001). A região submembrana contém uma rede de microfilamentos que conectam as glicoproteínas aos filamentos citoplasmáticos de actina, miosina e à calmodulina. Essa região mantém o formato discoide das plaquetas em repouso (Spencer e Becker, 1997). A zona sol-gel é a matriz do citoplasma e consiste em um sistema organizado de anel microtubular e filamentos de actina. O sistema de membranas inclui Complexo de Golgi, o sistema canalicular aberto conectado à superfície, o sistema tubular denso e o retículo endoplasmático rugoso (White, 1979). Por último, a zona das organelas contendo três principais grânulos secretores: grânulos- α , grânulos densos e lisossomos. Além disso, plaquetas apresentam mitocôndrias, importantes no

metabolismo energético (Melchinger et. al. 2019), glicossomos, cadeias eletrodensas e inclusões tubulares (White, 2007).

Os grânulos- α são as organelas mais abundantes, de 50 a 80 grânulos- α aproximadamente por plaqueta (Harrison e Cramer, 1993). Sua formação ocorre durante a maturação dos megacariócitos, por um mecanismo de empacotamento de proteínas sintetizadas ou endocitadas. As primeiras, como Fator von Willebrand (FvW) e Fator Plaquetário 4 (PF4, do inglês *Platelet Factor 4*), são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso do MK, transferidas para a rede trans-Golgi e então empacotadas em vesículas de armazenamento. As outras proteínas, como fibrinogênio e albumina, são endocitadas do citoplasma do MK e das plaquetas maduras e aparecem mais tardiamente (Flaumenhaft e Blair, 2009). As proteínas estocadas nestes grânulos tem papel crítico na hemostasia, inflamação e interação célula-matriz ou célula-célula (Gremmel et. al, 2016). Elas são proteínas grandes e podem ser classificadas em diferentes grupos: proteínas de adesão (P-selectina - CD62-P, fibrinogênio, integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, fibronectina e Fator von Willebrand), proteínas microbicidas (trombocidina 1 e trombocidina 2), quimiocinas (CXCL1/GRO- α , CXCL4/PF4, CXCL5/ENA-78, CXCL8/IL8, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES), fatores mitogênicos (fator de crescimento derivado de plaquetas -PDGF, fator de crescimento transformador -TGF- β , fator de crescimento endotelial vascular-VEGF, fator de crescimento epidêmico - EGF, fator de crescimento celular- ECGF, fator de crescimento semelhante à insulina- IGF), fatores de coagulação (Fator V, Fator VIII, Fator III) e inibidores de protease (inibidor 1 do ativador do plasminogênio -PAI 1, inibidor 1 da protease – PI-1, inibidor da via do fator tecidual -TFPI, inibidor de collagenase derivado de plaquetas - PDCI , inibidor de plaquetas do fator XI -PIXI) (Flaumenhaft e Sharda, 2019).

Os grânulos densos são menores do que os grânulos- α , menores em número e com maior variabilidade morfológica. São formados nos megacariócitos jovens, onde são preenchidos com nucleotídeo adenina e guanina, com as aminas serotonina e histamina, e com íons bivalentes (Ca^{2+} , PO_3^- , Mg^{2+}) (Rendu e Brohard-Bohn, 2001).

Por último, os grânulos denominados Lisossomos, são ligeiramente menores que os grânulos- α e maiores que os densos, e contém uma variedade de enzimas digestivas ativas em condições ácidas. São glicosidases,

proteases, collagenases, elastases, cathepsinas e proteínas de membrana lisossomal (LAMP-1, LAMP-2 e CD63) (Reed, 2007).

1.4 Ativação Plaquetária

Em condições de homeostase as plaquetas são mantidas em repouso através da liberação de prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (NO) pelo endotélio (Rumbaut e Thiagarajan 2010). Após o dano endotelial, o colágeno e proteínas da matriz extracelular são expostas permitindo que o FvW forme uma ponte entre o colágeno e o receptor plaquetário denominado, glicoproteína plaquetária (GP) Ib / V / IX. Já os receptores GP Ia / IIa e GP VI se ligam diretamente ao colágeno. A ligação do colágeno a esses receptores GP, induz a ativação da plaqueta, que inicia a liberação pelos seus grânulos, de agonistas como ADP, serotonina, trombina, tromboxano 2 (TXA₂) e adrenalina. Esses interagem com receptores específicos, acoplados a proteína G da plaqueta, aumentando os níveis de cálcio citosólico e ativando vias de sinalização específicas. A via final comum desses agonistas é a ativação do receptor GP IIb / IIIa, que resulta em sua ligação ao fibrinogênio e ao FvW, levando à agregação plaquetária (Hoffman et al., 2003; Jennings et al., 2009)

As plaquetas também podem ser ativadas por infecções bacterianas. A interação bactéria e plaquetas pode ocorrer de três formas: ligação das bactérias a uma proteína plasmática que é ligante para um receptor plaquetário; ligação direta das bactérias a um receptor de plaquetas; e secreção de produtos bacterianos, por exemplo, toxinas que se ligam às plaquetas (Fitzgerald et al., 2006). Por exemplo, *H. pylori* detecta o FvW plasmático por meio de uma proteína desconhecida, que, por sua vez, permite que ele interaja com GPIIb e desencadeie a agregação plaquetária (Byrne et al., 2003). Já, o LPS da *Escherichia coli*, demonstrou se ligar ao TLR4 (do inglês *Toll-like Receptor 4*) plaquetário, levando à ativação (Stahl et al 2006). E, *Porphyromonas gingivalis* é um patógeno oral que secreta uma família de cisteína proteases conhecidas como gingipainas. Essas toxinas podem induzir a agregação plaquetária de maneira análoga à trombina (Lourbakos et al., 2001).

As plaquetas ativadas sofrem mudança drástica em sua morfologia, passando de esféricas para ameboides com pseudópodia (Figura 1) (White 2007). Para isso, seu citoesqueleto de actina e microtúbulo anelar é remodelado. Primeiro os longos filamentos de actina são convertidos em vários filamentos curtos, de forma dependente de influxo de cálcio. Então, as extremidades de cada filamento encurtado, é alongada por adição de monômeros de actina, formando extensões laterais denominadas pseudópodes (Hartwig, 2007). Essa movimentação dos filamentos de actina cria uma força de constrição que induz a dissociação e rearranjo dos microtúbulos anelares, centralização das organelas e exocitose dos grânulos através do OCS (White 1968).

Figura 1 – Morfologia de plaquetas ativadas. a) Plaqueta quiescente em seu formato discóide (aumento x30.000). b) Plaquetas ativadas com seus pseudópodes estendidos em todas as direções (aumento x13.000). Imagens feitas por microscopia eletrônica (LVHR-SEM).

Fonte: WHITE et al., (2007)

Após ativadas, com a liberação do conteúdo de seus grânulos, passam a secretar citocinas, mediadores inflamatórios, proteínas de adesão e tornam-se aptas a interagir com outras plaquetas, células endoteliais, neutrófilos, monócitos, células dendríticas, células B e T (Thomas; Storey 2015). Também após a ativação, plaquetas expressam uma grande quantidade de receptores que podem ser rapidamente mobilizados dos grânulos para a superfície ou ter uma mudança conformacional para a forma ativa. Alguns deles são fundamentais para a interação das plaquetas com outras células, como P-

selectina (CD62-P), CD40L e GP IIb/IIIa (CD41/CD61). P-selectina, tem um papel importante na interação entre plaquetas e leucócitos, através de seu receptor PSGL-1/CD162. Monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células progenitoras hematopoiéticas expressam PSGL-1 (Thomaz e Storey 2015). A ligação P-selectina-PSGL-1 entre plaquetas e leucócitos é um evento importante da formação de agregados plaquetários-leucocitários, regulando positivamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a adesão ao endotélio (Blann et al., 2003). CD40L/CD154, possibilitam a interação das plaquetas com células dendríticas, linfócitos B e T, através da ligação CD40L-CD40 (Greawal e Flavell 1998). Também, as plaquetas são fonte predominante de CD40L solúvel (sCD40L), que pode induzir as células vasculares a expressarem E-selectina e P-selectina e liberarem interleucina- (IL-) 6 (Lindmark; Siegbahn 2000). GPs IIb/IIIa (CD41/CD61) em sua forma ativa se liga as proteínas de adesão, fibrinogênio ou FvW, e assim induzindo a agregação e ligação das plaquetas aos eritrócitos e células endoteliais (Annand et al., 2003).

Além da liberação dos fatores pré-formados estocados nos grânulos, as plaquetas ativadas são capazes de sintetizar proteínas específicas (Zimmerman et al., 2008). Isso é possível pois as plaquetas recebem dos megacariócitos, durante a plaquetogênese, pré-RNAm específicos junto com a maquinaria transcricional. Quando ativadas, ativam a maquinaria e geram mRNAs maduros que são subsequentemente traduzidos em proteínas (Weyrich et. al 2009). Algumas proteínas sintetizadas já descritas, incluem IL-1 β (Lindemann et. al. 2001), fator tecidual (Swertz et. al 2006), ciclooxigenase (COX)-1 (Evangelista et. al. 2006) e proteína reguladora Bcl-3 (Bcl-3, do inglês *B-cell leukemia protein 3*) (Weyrich et. al 1998).

1.5 Papel das plaquetas na inflamação

A função primária das plaquetas é a identificação de vasos lesionados e o início do processo de coagulação nesses locais. No entanto, atualmente já se sabe que as plaquetas tem importante papel no sistema imune, tanto pela expressão/produção de moléculas imunomoduladoras, mediadores lipídicos e

citocinas, como também por sua capacidade de interagir com várias células do sistema imunológico (Semple, et al., 2011).

As plaquetas expressam Receptores de Reconhecimento de Padrões PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) funcionais, visto que os receptores semelhantes a Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) de plaquetas humanas podem reconhecer e discernir várias isoformas do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Cognasse et al., 2008; Shiraki et al., 2003), e detectar padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) de diferentes invasores. Por exemplo, TLR4 expresso em plaquetas de murinos pode modular a produção de TNF- α em camundongos desafiados com LPS (Aslam et al., 2006). O LPS isolado da *E. coli* enteroemorrágica foi incapaz de se ligar as plaquetas de camundongos deficientes (*knockout*) para TLR4, mas foi capaz de se ligar às plaquetas dos camundongos selvagens. O LPS isolado da *E. coli* enteroemorrágica também foi detectado nas plaquetas isoladas de pacientes com Síndrome Hemolítico Urêmica associada a *E. coli* enteroemorrágica (Stahl et al., 2006). A interação de diferentes LPSs e TLR4 também leva a uma diferente resposta plaquetária, já que o sobrenadante de plaquetas sensibilizadas com LPS de *E. coli* e LPS de *Salmonella minnesota* induziu diferentes secreções de IL6, TNF- α e IL-8 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) (Berthet et al., 2012). Murinos knockout para TLR2 tiveram a formação de agregados plaquetas-neutrófilo prejudicadas, assim como diminuição da fagocitose de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* por neutrófilos, evidenciando o papel do TLR2 plaquetário na atuação de neutrófilos contra esses patógenos (Assinger et al., 2011).

As plaquetas contêm em seus grânulos quantidades consideráveis de proteínas antibacterianas, denominas trombocidinas 1 e trombocidina 2 que são variáveis das quimiocinas CXC (Krijgsveld et al., 2000). Foi mostrado que as trombocidinas matam várias cepas bacterianas, como *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Lactococcus lactis* e também o fungo *Cryptococcus neoformans* (Krijgsveld et al., 2000). Outra molécula microbicida derivada de plaquetas é a β defensina. Kraemer e colaboradores (2011) mostraram que as plaquetas liberam β

defensina 1 após serem estimuladas com alfa toxina do *S. aureus*, e que ela é responsável pela inibição do crescimento bacteriano na presença de plaquetas. Em outro achado, as plaquetas também foram capazes de conter o crescimento de *S. aureus* de forma dependente de trombina, e também aumentar sua fagocitose por macrófagos através da liberação de IL-1 β (Ali et al., 2017). Sugerindo que o papel das plaquetas vai além da interação direta com o patógeno, mediando a ação efetora de leucócitos durante a infecção.

Outra característica importante das plaquetas, para sua função no sistema imune é a secreção de citocinas (Bakogiannis et al., 2019) e expressão de receptores tornando-as capazes de serem efetoras e também detectarem sinais dos locais de inflamação (Flaumenhaft et al., 2009). Durante dano vascular, monócitos interagem com o endotélio e induzem a secreção de CCL5 (RANTES) por plaquetas via P selectina (Weyrich et al., 1996). Isto aumenta o recrutamento de monócitos para o sítio de inflamação e induz a secreção de IL-8 e MCP-1 por estas células (Hundelshausen et al., 2001). CCL5 derivada de plaquetas também potencializa a habilidade citotóxica e produção de quimiocinas por linfócitos T CD8⁺ (Crawford et al., 2011). A quimiocina CXCL4 (PF4) promove a sobrevivência de monócitos e induz a diferenciação em macrófagos (Scheuerer et al., 2000). PF4 também induziu a migração de monócitos de linhagem, de maneira dependente ao receptor CCR1 (Fox et al., 2018). CXCL4 também possui atividade antiparasitária, visto que plaquetas são capazes de eliminar eritrócitos infectados por *Plasmodium* (Kho et al., 2018; McMorran et al., 2009) de forma dependente desta quimiocina (McMorran et al., 2012). Outra quimiocina derivada de plaquetas é CXCL7 (NAP-2, do inglês *neutrophil-activating peptide 2*). A interação dessa quimiocina com receptor é importante para o *crosstalk* neutrófilos-plaquetas (Brown et al., 2017). Camundongos levados a lesões endoteliais, por isquemia e reperfusão traumática, demonstraram migração dirigida de leucócitos aos trombos plaquetários via liberação de CXCL7 dos grânulos α de plaquetas. O bloqueio farmacológico do receptor de CXCL7, bem como a deleção genética de CXCL7, diminuiu significativamente a migração de leucócitos através dos agregados plaquetários (trombos) mostrando que CXCL7 forma um gradiente

quimioestático guiando os leucócitos aos locais lesionados (Ghasemzadeh et al., 2013).

Além disso, plaquetas ativadas passam a expressar CD40L que induz a expressão de E-selectinas, VCAM-1 e ICAM-1, além da secreção de IL-8 e MCP-1 por células endoteliais (Henn et al., 1998). CD40L de plaquetas de murinos previamente ativadas foram capazes de levar a maturação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs, do inglês *bone marrow-derived dendritic cells*) estimuladas com *S. aureus*, além de aumentar a fagocitose e morte das bactérias internalizadas, pelas BMDCs (Nishat et al., 2018). Também, o CD40L de plaquetas induziu a troca de isotipo em células B e melhora da resposta das células TCD8 durante infecção por adenovírus (Elzey et al., 2003). As plaquetas expressam MHCI em sua superfície (Kao et al., 1986) e também o proteossoma envolvido no processamento e apresentação de antígenos via MHCI (Zufferey et al., 2014). Um exemplo da funcionalidade do MHCI plaquetário está no trabalho que mostra que plaquetas processaram antígeno derivado do patógeno *Plasmodium berghei* e apresentaram via complexo antígeno-MHCI ativando as células T (Chapman et al., 2012). O MCHI de plaquetas também pode ser usado para diferenciar plaquetas novas e velhas, já que essas perdem MCHI de suas superfícies ao longo do tempo (Angénieux et al., 2019).

Portanto, as plaquetas além do seu papel na coagulação, tem como função defesa antimicrobiana, via reconhecimento de patógenos por seus receptores (e ação por peptídeos microbicidas, por exemplo), aumento de efetores imunes inatos (por exemplo, sinalização aos neutrófilos) e cooperação com a resposta imune adaptativa (via interações com células apresentadoras de antígenos, células T e células B) (Figura 2) (Yeaman et al., 2014).

Figura 2 – Plaquetas e Sistema Imune. As plaquetas ativadas migram até o local de infecção, reconhecem o patógeno e liberam peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs, do inglês *host-defence peptides*). Através de quimiocinas, recrutam neutrófilos para o local da infecção. Interação com as células do sistema imune adaptativo, células apresentadoras de antígenos (APCs), células T e B, pelos ligantes CD40-CD40L e outras interações de co-sinalização. Paralelamente, as plaquetas percebem os estímulos derivados do endotélio ferido ou infectado e catalisam a formação de coágulos de fibrina-plaquetas, que são necessários para a hemostasia. Fonte: YEAMAN et al., (2014).

1.6 Metabolômica e metabolismo de plaqueta

O metabolismo celular é definido como um conjunto de processos bioquímicos nas células que produzem ou consomem energia. As vias do metabolismo central, que envolvem nutrientes abundantes como ácidos graxos e aminoácidos, podem ser separadas em três classes: as vias que sintetizam moléculas (anabolismo), vias que degradam moléculas (catabolismo) e as vias

que eliminam resíduos tóxicos produzidas por outras classes (destinação de resíduos) (DeBerardinis; Thompson 2012). O metabolismo celular não é responsável apenas pela sobrevivência e proliferação celular, mas também por sua resposta efetora no sistema imunológico (Man et al., 2016).

As células envolvidas na resposta imune, quando ativadas passam por uma mudança na expressão de diversos genes, resultando em novas funções como produção de citocinas, mediadores lipídicos, enzimas, capacidade de migrar para os tecidos e/ou sofrer divisão celular. Essa transição de estado quiescente para ativado requer uma distribuição de pequenas moléculas (metabólitos) em diferentes vias, portanto determinadas vias metabólicas são reguladas para direcionar tais mudanças funcionais (Pearce; Pearce 2013).

As tecnologias de triagem de alta produtividade (tecnologias ômicas) são ferramentas atuais, importantes no estudo do sistema imune humano. São elas proteômica, transcriptômica, genômica, lipidômica e metabolômica. Esses métodos também passaram a ser aplicados em plaquetas, permitindo uma compreensão holística da biologia plaquetária (Figura 3) (Gutmann et al., 2020).

Figura 3 – Esquema das análises “-ômicas” possíveis a ser aplicadas em plaquetas.

Fonte: GUTMANN et al., (2020)

O termo metabolômica é relativamente novo, e foi definido em 2001 por Fiehn e colaboradores. Metabolômica é o perfil global de pequenas moléculas que podem ser identificadas em células, tecidos, biofluidos e organismos (Li et al., 2015). As duas principais plataformas de química analítica usadas em metabolômica, para separação, detecção e caracterização de metabólitos, são Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (MS) (Idle et al., 2007). Essa última, pode estar acoplado à técnicas de separação como Cromatografia Gasosa (GC-MS), Cromatografia líquida (LS-MS) e Eletroforese capilar (CE-MS), que são populares por sua alta seletividade, sensibilidade e cobertura (Shulaev et al., 2006).

O estudo de metabolômica pode ser dividido em duas abordagens: *untargeted* e *targeted*. A abordagem *untargeted* consiste na análise abrangente de todos os metabólitos passíveis de detecção em uma amostra, incluindo espécies químicas desconhecidas. É necessário junto com essa abordagem, utilizar métodos estatísticos para reduzir os extensos conjuntos de dados gerados em um conjunto menor de variáveis, facilitando a análise. A metabolômica *targeted* consiste na medida de um número de metabólitos limitados e já conhecidos quimicamente. Os compostos devem ser conhecidos e também estarem disponíveis em sua forma pura (padrões na forma purificada) (Roberts et al., 2012).

As plaquetas apresentam alta plasticidade metabólica, com alterações no metabolismo de ácidos graxos por exemplo, requisito para fosforilação oxidativa, permitindo sua ativação e consequente mudança conformacional (formação de filopódios), secreção de grânulos e formação de microvesículas (Leprore et al., 2018). A formação de mediadores secundários, também é essencial para regulação da ativação plaquetária (Nocella et al., 2017).

Chacko e colaboradores relacionaram a bioenergética e a metabolômica de plaquetas, a fim de entender a plasticidade metabólica de plaquetas frente a um estresse oxidativo. Para isso, usaram como controle positivo plaquetas

tratadas com oligomicina, a qual inibe a ATP sintase das mitocôndrias. As plaquetas submetidas a oligomicina, apresentaram 89 metabolitos diferencialmente abundantes, relacionados com o enriquecimento das vias metabólicas de pirimidina, glicólise, gluconeogenesis e novos ácidos graxos. Nessa mesma linha, Ravi e colaboradores mostraram que os inibidores etomixir e trimetazidina, por inibir oxidação de ácidos graxos, diminuíram a taxa basal de consumo de oxigênio, por plaquetas estimuladas por trombina, além de afetaram a respiração basal das mesmas. Esses dados sugerem que o metabolismo de ácidos graxos ocorre em plaquetas ativadas. Slatter e colaboradores continuaram essa investigação e mostraram a ligação entre mobilização lipídica e bioenergética mitocondrial das plaquetas através do lipidoma das plaquetas estimuladas ou não com trombina. A fosfolipase citosólica A₂ (cPLA₂) de plaquetas ativadas com trombina, é responsável por fornecer os substratos, ácidos graxos e eicosanoides, para a beta oxidação mitocondrial e assim produção energética, via ATP.

O metaboloma pode ser reflexo de alguns fenótipos das plaquetas. Um estudo sobre a viabilidade de plaquetas usadas em transfusão mostrou que o metabolismo de lipídios das plaquetas após armazenamento, foi associado negativamente a sua sobrevivência e derivados do metabolismo de xenobióticos foi associado negativamente a sua recuperação pós transfusão (Zimring et al., 2016). Análises metabolômicas também foram feitas em plaquetas de pacientes com doença da artéria coronária que não apresentaram resposta ao tratamento com aspirina. No entanto, o perfil metabólico das plaquetas de pacientes não responsivos ao tratamento com aspirina não apresentou diferença significativa quando comparado com o de pacientes responsivos. Apenas em pacientes abaixo dos 65 anos, baixos níveis de glicina podem sugerir associação a não resposta a aspirina. (Chiang et al., 2019).

Ainda no contexto de metaboloma e doenças, a metabolômica e lipidômica do plasma de pacientes com dengue, comparados a indivíduos saudáveis, revelou 60 metabolitos diferencialmente abundantes, envolvidos principalmente nas vias de biossíntese de ácidos graxos, beta oxidação, catabolismo de fosfolipídios etc. E as plaquetas tiveram associação positiva com esfingolipídios (Cui et al., 2013). Um estudo mais recente, usou a metabolômica para detectar níveis de serotonina plasmática, molécula

derivada de plaquetas, em pacientes com dengue e com dengue hemorrágica. Os resultados mostraram que em voluntários com DHF, os níveis de serotonina foram significativamente mais baixos. Além disso, a correlação entre plaquetas e serotonina foi positiva, e os níveis de serotonina relacionados ao grau de trombocitopenia (Cui et al., 2016). Gardinassi e colaboradores integraram dados metabolômicos plasmáticos e dados transcriptômicos de sangue total obtidos de voluntários infectados com *P. vivax*. Eles descobriram que os eventos moleculares desencadeados pela infecção, envolviam significativamente ativação das plaquetas, módulos de assinatura de IFN e a sinalização de células T. Além disso, as plaquetas estavam associadas ao desenvolvimento de tolerância a sintomas clínicos em humanos com malária.

Assim, visto que o metabolismo das plaquetas está associado com sua ativação, e consequente secreção de inúmeras moléculas com papel no sistema imune, fica claro a importância dessa abordagem para a compreensão da resposta plaquetária a um estímulo bacteriano. Em conjunto, estes estudos sugerem que plaquetas possuem funções importantes nas infecções bacterianas e que podem regular a resposta imune. Visto que a infecção pulmonar por *A. xylosoxidans* induz rápido acúmulo de leucócitos com cinéticas diferentes ao longo da infecção, nós formulamos a hipótese de que plaquetas contribuem significativamente na infecção por este bacilo, atuando no controle do crescimento bacteriano por meio da interação direta e/ou indireta via secreção de moléculas antimicrobianas. Portanto, nessa dissertação nós nos propusemos a investigar *in vitro* a interação de plaquetas com *A. xylosoxidans*, assim como determinar seu perfil metabólico no decorrer da infecção experimental.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a função e perfil metabólico de plaquetas em resposta à infecção experimental por *A. xylosoxidans*.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a interação entre plaquetas e *A. xylosoxidans*, e se esta interação inibe o crescimento bacteriano;
- Determinar se plaquetas são ativadas durante interação com *A. xylosoxidans* por meio da expressão de P selectina;
- Obter o perfil metabólico durante a interação entre plaquetas e *A. xylosoxidans*;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem bacteriana

Foi utilizada a cepa LMG 1863 de *A. xylosoxidans*, gentilmente cedida pela Prof^a. e Dr^a. Ana Lúcia da Costa Darini do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologista Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo FCFRP – USP. A cepa de primeira passagem foi primeiramente cultivada em caldo “Brain Heart Infusion” BHI (Laboratórios Conda S.A, KASVI – Espanha) acrescido de 20% de glicerol por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, e estocada em freezer a -80°C e submetida a testes para confirmação da pureza. Anteriormente a cada experimento, a cepa foi cultivada em ágar BHI e mantida em estufa 37°C 5% de CO₂, e após 18 horas de cultivo as bactérias foram quantificadas através de leitura da D.O. a 600 nm em espectrofotômetro, de forma que a suspensão atingisse a escala de 21×10^8 bactérias por ml (Prado et al., 2017).

3.2 Casuística

Para realização do presente trabalho, foram recrutados 23 indivíduos saudáveis, pertencentes à comunidade USP, como funcionários e alunos, de ambos os gêneros, com idade entre 18 a 60 anos. Em contrapartida, foram excluídos da pesquisa mulheres grávidas, crianças, idosos acima de 60 anos, fumantes e indivíduos com histórico de doenças agudas e crônicas. Ainda, foram excluídos aqueles que faziam uso de medicamentos que promovem alterações no sistema imunológico, tais como, anti-inflamatórios. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada participante voluntário. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CAAE: 06825118.0.0000.5403 - CEP/FCFRP-USP: nº 496) (Anexo).

3.3 Isolamento de plaquetas

Sangue periférico total foi coletado por meio de punção venosa em tampão ACD (8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de dextrose; pH 5,1) e posteriormente centrifugado a 200 x g por 20 min a temperatura ambiente. Plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletado e incubado

com PBS em uma razão de 1:1 (v/v), adicionando PGE₁ (1μM) para evitar sua ativação. PRP foi centrifugado a 200 x g por 11 min a temperatura ambiente para remover leucócitos e eritrócitos contaminantes. O sobrenadante foi então transferido a um novo tubo, o qual foi centrifugado a 500 x g por 15 min. a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet de plaquetas foi gentilmente lavado com PBS. As plaquetas foram suspensas em tampão Tyrode's (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) contendo 5 mM glicose e BSA (3 mg/ml). As plaquetas foram diluídas em Oxalato de amônia (1%), quantificadas em Câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de 1x 10⁶ células/mL.

3.4 Ensaios de *killing* e contagem de CFU

Os ensaios de *killing* mediado por plaquetas foram realizados como descrito previamente (Ali et al., 2017), com algumas modificações. Plaquetas (1 x 10⁶) foram incubadas com *A. xylosoxidans* em uma placa de cultura de 96 poços em uma razão de 1:10. A solução foi incubada por 10 minutos, 2, 4 e 8h a 37 °C 5% de CO₂. Após incubação, diluições seriadas da amostra foram plaqueadas em BHI-ágar a 37 °C por 36h, até a contagem manual de CFU.

3.5 Citometria de fluxo

Para avaliar a expressão de P selectina e ativação de plaquetas *in vitro*, incubamos plasma rico em plaquetas (PRP) e *A. xylosoxidans* em uma razão de 1:10 ou 0.05 U de PMA/mL por 30 min em temperatura ambiente. As plaquetas foram fixadas com PBS 1X contendo 1% formol por 30 minutos e lavadas com tampão Tyrode's. As células foram marcadas com anticorpo anti-CD62P humano conjugado com PE (BioLegend) e com anticorpo anti-CD41 humano conjugado com FITC (BioLegend). Por fim, as células foram centrifugadas à 1.500 g por 5 minutos e suspensas em 200μL de Tyrode's. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo (FACs canto II) do Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo da FCFRP-USP e as análises foram feitas com o programa FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software v10.0.8).

3.6 Microscopia confocal

Bacilos de *A. xylosoxidans* foram marcados com isocianato de fluoresceína (FITC) como descrito previamente (Prado et al., 2017). Plaquetas isoladas de humanos (5×10^6 plaquetas/poço) foram incubadas com bactérias marcadas na razão de plaqueta/bactéria (1:10) em meio RPMI por 2h em câmaras específicas (*CELLview slides*-Greiner Bio-One). As células foram fixadas com 2% de paraformaldeído por 10 minutos e marcadas com anticorpo anti-CD41 (BioLegend) por 12 horas (“overnight”) à 4°C. Em seguida centrifugadas à 800 rpm por 4 minutos, lavadas com PBS 1X e marcadas com anticorpo secundário conjugado com Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific), por 45 minutos. Por fim, as células foram centrifugadas à 800 rpm por 4 minutos, lavadas com PBS 1X e suspensas em *Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium*. As imagens foram analisadas no microscópio confocal de escaneamento a laser da infraestrutura multiusuário de microscopia da FCFRP, modelo Leica TCS SP8.

3.7 Análises de metabolômica empregando HRLC-MS

Para análise global de metabólitos, usamos a tecnologia de espectrometria de massas de alta resolução acoplada a cromatografia líquida (HRLC-MS) conforme descrito anteriormente (Gardinassi et al., 2017a, 2018), com algumas alterações. As amostras de plaquetas (1×10^8) isoladas de sangue total incubadas ou não com *A. xylosoxidans* foram incubadas e lisadas com acetonitrila: água (2:1, v/v); o sobrenadante de plaquetas incubadas com bactérias *in vitro* foram homogeneizados com acetonitrila (2:1, v/v). Ambas as extrações continham uma mistura de padrões internos marcados com isótopos estáveis. As amostras foram então incubadas à 4°C por 30 min. Posteriormente, restos celulares e proteínas do plasma foram precipitadas por meio de centrifugação a 10.000g por 10 min à 4°C. Os sobrenadantes foram então transferidos para um tubo do amostrador automático para posterior análise por HRLC-MS, utilizando o sistema TripleTOF 5600+ (Sciex, EUA) acoplado a cromatografia líquida por coluna de HILIC (localizado Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios - CEQIL) coordenado pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli. Os espectros de massa foram adquiridos pela ionização por eletro spray (ESI) no modo positivo e

escaneamento total (full scan) e a variação de massa/carga (m/z) foi estabelecida entre 85 a 1275 a uma resolução de 40.000. A detecção dos picos, filtragem de ruído, alinhamento do tempo de retenção e a quantificação de metabólitos foram realizados com a linguagem computacional R e o pacote apLCMS (Yu et al., 2009). Análises posteriores foram feitas com diversas ferramentas computacionais de última geração (Gardinassi et al., 2017b). Os íons detectados foram definidos por m/z e tempo de retenção, com valores de intensidade associados a cada amostra e réplicas. Os dados foram transformados para escala log2 para aproximar os dados a uma distribuição normal e normalizados pela média, de acordo com a necessidade. Os compostos detectados foram então filtrados para reter apenas aqueles presentes em ao menos 80% de todas as amostras. Anotações putativas foram realizadas por meio da similaridade de m/z presentes na base de dados KEGG (precisão da massa menor que 10ppm). O programa mummichog (versão 1.0.10) foi utilizado para análise de enriquecimento em vias e redes metabólicas (Li et al., 2013).

3.8 Padronização

3.8.1 Padronização ensaios de *killing*

Para entender como plaquetas interagem e/ou inibem crescimento de *A. xylosoxidans*, primeiro padronizamos a multiplicidade de infecção (MOI) adequada de *A. xylosoxidans* na presença de plaquetas. Inicialmente, incubamos um número fixo de bactérias (1×10^5) com número crescente de plaquetas isoladas de 3 voluntários por 4h (Fig. 4a). Visto que todas as concentrações de plaquetas inibiram crescimento bacteriano, em seguida incubamos diferentes números crescentes de plaquetas - 1×10^3 (Fig. 4b), 1×10^4 (Fig. 4c) e 1×10^5 (Fig. 4d) - com bactérias em MOIs variados: 1:1, 1:10, 1:50 e 1:100 (PLT: *A. x.*) por 4h. A bactéria cultivada sem plaquetas foi utilizada como controle (CTL). Observou-se que 1×10^3 (Fig. 4b) e 1×10^4 (Fig. 4c)

Figura 4 – Padronização do número de plaquetas e MOI de incubação com *A. xylosoxidans* a) *A. xylosoxidans* (1x10⁵) foi incubada com plaquetas em diferentes MOI (A.x.:PLT 1:1, 1:10, 1:50 e 1:100) por 4h. b – d) Plaquetas isoladas de 3 voluntários - b) 1x10³ plaquetas, c) 1x10⁴ plaquetas e d) 1x10⁵ plaquetas - foram incubadas com *A. xylosoxidans* em diferentes MOIs (PLT:A.x. 1:1, 1:10, 1:50 e 1:100) por 4h. Os dados estão expressos como unidades formadoras de colônia por ml (CFU/ml). * $p < 0.05$ para CLT vs. A.x.: Plaquetas ou Plaquetas: A.x.

plaquetas não inibiram crescimento das bactérias, já que o CFU de bactérias cultivadas com plaquetas aumentou em relação ao controle e foi dependente do aumento do MOI. Em contraste, observou-se que 1x10⁵ plaquetas foi capaz

de inibir o crescimento bacteriano em relação as bactérias cultivadas sem plaquetas e o aumento no CFU também foi dependente do aumento do MOI, porém sempre reduzido em relação ao controle (Fig. 4d). Baseado nestas análises preliminares, foi definido que os ensaios para avaliação da atividade microbica de plaquetas seriam realizados com o mínimo de 1×10^5 plaquetas de cada voluntário e MOI de 1:10 (PLT:A.x.). Após definir o MOI de incubação entre plaquetas e *A. xylosoxidans*, iniciamos a padronização do experimento de atividade microbica, no qual incubamos plaquetas (1×10^5), isoladas de 3 voluntários diferentes, com a bactéria (MOI 1:10) por 10 min., 2, 4, 8 e 24h. Devido ao grande número de colônias formadas após 24h, isto inviabilizou a contagem manual das mesmas, e portanto, excluimos este ponto da análise. O cálculo da porcentagem de morte da bactéria individualmente sugere atividade diferencial de plaquetas de cada voluntário (Fig. 5a, c, e). A dinâmica de crescimento do CFU sugere que plaquetas tenham ação microbica contra *A. xylosoxidans*, especialmente após 2h de incubação, avaliando cada indivíduo separadamente (Fig. 5b, d, f) ou a média das 3 amostras (Fig. 5g).

Entretanto, a dinâmica de crescimento de CFU/ml mostra que as bactérias incubadas somente com RPMI tiveram pico de crescimento após 2h, os quais voltaram a níveis basais após 8h (Fig. 5). O resultado esperado deste experimento controle é de que o CFU/ml deve aumentar com tempo de incubação, surgindo a questão sobre a necessidade de outros nutrientes para crescimento dos controles.

Figura 5 – Padronização do ensaio de atividade microbicida. Plaquetas humanas isoladas de 3 voluntários foram incubadas com *A. xylosoxidans* (PLT:A.x. 1:10) por 10 min, 2h, 4h ou 8h. O gráfico em barra representa a % de morte de bactéria e dinâmica de crescimento de CFU de bactérias incubadas com plaquetas de cada indivíduo, Voluntário 1 (a, b), Voluntário 2 (c, d), Voluntário 3 (e, f). O gráfico linear (g) representa média $\pm$ S.E.M (n=3), * $p < 0.05$ para PLT + A.x. vs. A.x.

Com crescimento inadequado da bactéria no experimento controle, nós decidimos realizar a incubação de plaquetas e bactérias em RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino. Também observamos que havíamos incubado as plaquetas com número maior de bactérias do que inicialmente previsto (Fig. 6).

A partir deste ponto, decidimos que os próximos experimentos seriam realizados com 1×10^6 plaquetas e MOI de 1:10 (PLT : A.x.).

Figura 6 – Finalização da padronização do ensaio de atividade microbicida. Plaquetas humanas isoladas de 3 voluntários foram incubadas com *A. xylosoxidans* (PLT:A.x. 1:10) por 10 min, 2h, 4h ou 8h. O gráfico em barra representa a % de morte de bactéria e dinâmica de crescimento de CFU de bactérias incubadas com plaquetas de cada indivíduo, Voluntário 7 (a, b), Voluntário 8 (c, d), Voluntário 9 (e, f). O gráfico linear (g) representa média $\pm$ S.E.M (n=3), * $p < 0.05$ para PLT + A.x. vs. A.x.

3.8.2 Padronização da expressão de P selectina por plaquetas

A expressão da P-selectina (CD-62P) é um dos principais marcadores de ativação plaquetária. Para estabelecer a ativação plaquetária em resposta a *A. xylosoxidans*, primeiro testamos três diferentes tempos de incubação de PLT com a bactéria e também três diferentes concentrações de plaquetas. A ativação com PMA foi utilizada como controle positivo. Na figura 4, observa-se que plaquetas incubadas com *A. xylosoxidans* apresentaram maior porcentagem de expressão de P-selectina após 30 minutos, com a concentração de 1×10^8 plaquetas (Figura 7).

Figura 7 – Padronização da expressão de P selectina por plaquetas. Plasma Rico em plaquetas (PRP), de um voluntário, foi incubado com *A. xylosoxidans* ou PMA por 10, 30 e 60 minutos. Em cada tempo, apenas nas condições PLT+A.x., a quantidade de plaquetas variou em 10^6 , 10^7 e 10^8 . A condição só plaqueta (PLT) é o controle negativo.

3.9 Análises estatísticas

As análises dos dados foram realizadas com o programa computacional GraphPad Prism v 6.0. Os testes Student's t-test, ANOVA ou Kruskal–Wallis seguido de testes de comparações múltiplas foram usados para avaliar as diferenças entre grupos independentes. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 As plaquetas são ativadas na presença da *A. xylosoxidans*

A expressão da P-selectina (CD-62P) é um dos principais marcadores de ativação plaquetária. Nesse contexto, nosso primeiro objetivo foi estabelecer a ativação plaquetária em resposta a *A. xylosoxidans*, utilizando a estratégia representada na figura 8. As plaquetas foram identificadas pela marcação com CD41 e dentro desta *gate* avaliamos a expressão de CD62P.

Para determinar se plaquetas são ativadas quando incubadas com *A. xylosoxidans*, isolamos o plasma rico em plaquetas de voluntários saudáveis, e incubamos com o bacilo, ou com PMA ou PRP sem nenhum estímulo. Posteriormente usamos a marcação já mencionada com anticorpos anti as moléculas de superfície CD41 e CD62P.

Então avaliamos a porcentagem de expressão e média da intensidade de fluorescência (MIF) das plaquetas de cada voluntário (Fig. 9). De maneira geral, observa-se que PMA induz expressão de CD62P nas plaquetas de todos os voluntários. Porém, a expressão de CD62P foi bastante variável quando plaquetas foram incubadas com *A. xylosoxidans*. Por exemplo, o voluntário 13 apresentou quase 25% de expressão, enquanto o voluntário 18 não apresentou diferença entre PLT estimuladas com *A. xylosoxidans* e não estimuladas.

Apesar das respostas variadas de cada indivíduos, observamos que em média, tanto a porcentagem de plaquetas que expressaram P-selectina quanto a média da intensidade de fluorescência de CD62P foi significativamente maior após incubação com *A. xylosoxidans*. Desta forma, conclui-se que plaquetas são ativadas por este bacilo (Fig. 10).

Figura 8 - Estratégia de *gating* da marcação de plaquetas. Plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido de um voluntário e avaliado por citometria de fluxo com a marcação de CD41 e CD62P. a) Plaquetas em repouso, b) plaquetas incubadas com *A. xylosoxidans* e c) plaquetas incubadas com PMA (0.05 U).

Figura 9. Expressão variada de CD62P após estímulo com *A. xylosoxizans*. Plasma rico em plaquetas (PRP) foi incubado com *A. xylosoxizans*, PMA ou RMPI por 30 minutos e sua ativação foi mensurada pela expressão da P-selectina via citometria de fluxo. Plaquetas foram identificadas com anticorpo anti-CD 41 marcado com FITC. Os gráficos representam valores individuais: Voluntário 3 (d e e), Voluntário 12 (f e g), Voluntário 13 (h e i), Voluntário 14 (j e k), Voluntário 15 (l e m) e Voluntário 16 (n e o), Voluntário 17 (p e q), Voluntário 18 (r e s) e Voluntário 11 (t e u).

Figura 10 – Plaquetas são ativadas na presença de *A. xylosoxidans*. Plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido de 3 voluntários e avaliado por citometria de fluxo com a marcação de CD41 e CD62P. Porcentagem de plaquetas expressando CD62P (A) e média de intensidade de fluorescência de CD62P (B) em plaquetas incubadas com *A. xylosoxidans*, PMA ou apenas RPMI por 30 minutos. A barra de erro representa a média + S.E.M (n=9), * $p < 0.05$ para PLT + A.x. vs. PLT. Análises foram feitas pelo teste one-way ANOVA e test t.

4.2 As plaquetas apresentam mudança morfológicas em contato com *A. xylosoxidans*

Nossos dados demonstraram que as plaquetas são ativadas quando estimuladas com *A. xylosoxidans*. Porém, a partir destes dados não é possível entender se plaquetas são ativadas pela interação direta com a bactéria ou apenas por reconhecimento de produtos bacterianos como LPS. Dessa forma as plaquetas isoladas dos voluntários foram incubadas sem estímulo ou com *A. xylosoxidans* previamente marcada com FITC, e então marcadas com anticorpo anti CD41 e IgG-anti-mouse conjugado com AlexaFluor (Alexa 594).

Observamos que as plaquetas sem estímulo apresentam a conformação esférica, característica de plaquetas em repouso. Já as plaquetas incubadas com o bacilo, apresentam pseudopodia sinalizando a ativação plaquetária (Figura 11).

Figura 11 – Plaquetas apresentam formação de pseudópodes após contato com *A. xylosoxidans*. Plaquetas humanas isoladas de voluntários foram incubadas com *A. xylosoxidans* previamente marcadas com FITIC, e marcadas com anticorpo anti-CD41 e posteriormente reveladas com IgG-anti-mouse conjugado com AlexaFluor 594. a) *A. xylosoxidans* b) Plaquetas sem estímulo. c) Plaquetas estimuladas com PMA. d) Plaquetas incubadas com *A. xylosoxidans*. Após 2h de incubação, as imagens foram analisadas por Microscopia confocal.

4.3 As plaquetas tem efeito microbicida contra *A. xylosoxidans*

Nossos dados até agora demonstraram que as plaquetas são capazes de serem ativadas na presença da *A. xylosoxidans*. Então, nosso

próximo passo foi investigar se as plaquetas são capazes de inibir o crescimento de *A. xylosoxidans*. Para isso, plaquetas (1×10^6) humanas isoladas de 6 voluntários foram incubadas com bactéria por 10 minutos, 2, 4 e 8 horas a 37° C (PLT:A.x. 1:10) e a atividade bactericida foi quantificada por contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) das bactérias viáveis ou por porcentagem de bactérias mortas. Observa-se nas figuras 9 e 10 (experimentos independentes) que a bactéria incubada somente com RPMI completo apresentou aumento do CFU que foi dependente do tempo de incubação. Ainda, as plaquetas de todos os voluntários inibiram crescimento da bactéria, e em média apresentaram atividade microbicida significativa após 8h de incubação (Fig. 12g e 13g). Desta forma, concluímos que as plaquetas humanas apresentam atividade microbicida e/ou inibem crescimento de *A. xylosoxidans* diretamente.

Figura 12 – Plaquetas inibem o crescimento de *A. xylosoxidans*, após 8 horas. Plaquetas humanas isoladas de 3 voluntários foram incubadas com *A. xylosoxidans* (PLT:A.x. 1:10) por 10 min, 2h, 4h ou 8h. O gráfico em barra representa a % de morte de bactéria e dinâmica de crescimento de CFU de bactérias incubadas com plaquetas de cada indivíduo, Voluntário 5 (a, b), Voluntário 6 (c, d), Voluntário 4 (e, f). O gráfico linear (g) representa média $\pm$ S.E.M (n=3), * $p < 0.05$ para PLT + A.x. vs. A.x. Análises foram feitas pelo teste Two-way ANOVA e test t.

Figura 13 – Plaquetas inibem o crescimento de *A. xylosoxidans*. Plaquetas humanas isoladas de 3 voluntários foram incubadas com *A. xylosoxidans* (PLT:A.x. 1:10) por 10 min, 2h, 4h ou 8h. O gráfico em barra representa a % de morte de bactéria e dinâmica de crescimento de CFU de bactérias incubadas com plaquetas de cada indivíduo, Voluntário 11 (a, b), Voluntário 12 (c, d), Voluntário 13 (e, f). O gráfico linear (g) representa média ± S.E.M (n=3), * $p < 0.05$ para PLT + A.x. vs. A.x. Análises foram feitas pelo teste Two-way ANOVA e test t.

4.4 Perfil metabólico das plaquetas é alterado na presença da *A. xylosoxidans*.

Visto, até então, que as plaquetas são ativadas e apresentam atividade microbica na presença da *A. xylosoxidans*, avaliamos a seguir o perfil

metabólico das plaquetas frente a esse estímulo. Para tanto, incubamos plaquetas isoladas do sangue periférico de voluntários saudáveis, com *A. xylosoxidans* ou incubamos só plaquetas ou só *A. xylosoxidans*, nos tempos de 10 minutos, 2,4 e 8 horas de estímulo, os metabólitos foram extraídos com acetonitrila e água. As comparações entre as intensidades dos compostos detectados nas plaquetas estimuladas com as não estimuladas, mostraram diferenças no perfil metabólico dessas células, já que existe diferença significativa na abundancia relativa de diversos metabólitos ao longo dos tempos de estímulo (Figura 15a). Ainda, percebemos maior número de metabólitos regulados positivamente (pontos vermelhos) em relação aos metabólitos regulados negativamente (pontos azuis), sugerindo que a *A. xylosoxidans* induz a alterações metabólicas nas plaquetas (Figura 15a). Ao analisarmos a sobreposição do número de metabólitos diferencialmente abundantes ao longo dos tempos de estímulo, percebemos que estas alterações são provocadas em sua maioria, pela presença da bactéria e não pelo tempo de estímulo, já que o maior número de metabolitos (298), foram compartilhados em todos os tempos de incubação (Figura 15b). Por exemplo, no tempo de 8h, de 725 metabolitos diferencialmente abundantes uma grande parte deles (aproximadamente 40%) está presente em todos os tempos e apenas 162 (aproximadamente 20%) são específicos a esse tempo. E os outros 40% são compartilhados por pelo menos mais um tempo de estímulo. Isso também acontece nos tempos de 10 minutos, 2 e 4 horas. Em contrapartida, a análise das vias metabólicas enriquecidas demonstra que ao longo dos tempos de estímulo os metabolismos de xenobióticos, pirimidina e acido graxos são perturbados. O tempo de 8h, apresentou maior diversidade de vias metabólicas enriquecidas, como metabolismo de acido graxos, ômega 6, pirimidina e xenobioticos. Esses dados sugerem que as plaquetas estimuladas com a bactéria, alteraram seu perfil metabólico em resposta ao patógeno.

Metaboloma de *Achromobacter xylosoxidans*

Figura 14 – Perfil metabólico de *A. xylosoxidans*. Cobertura atual nas vias KEGG por metabolômica LC-MS, através dos dados gerados por nosso grupo. Cada ponto preto é um metabolito correspondente. O mapa metabólico KEGG completo pode ser visualizado em alta resolução em https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?axy01100. Metabolitos foram extraídos da cultura de *A. xylosoxidans* após 10 min, 2h, 4h ou 8h.

Figura 15 – Perfil metabólico das plaquetas é alterado na presença da *A. xylosoxidans*. Plaquetas humanas isoladas foram incubadas com *A. xylosoxidans* (PLT:A.x. 1:10) por 10 min, 2h, 4h ou 8h. O sobrenadante foi coletado e análises foram feitas por LS-MS. a) abundância diferencial de compostos ionizados (metabólitos) de plaquetas estimuladas com *A. xylosoxidans* versus plaquetas não estimuladas. Metabólitos significativos foram identificados por *t* teste moderado e a significância foi estabelecida em $p < 0,05$. b) Diagrama de Venn para avaliar sobreposição de metabólitos diferencialmente abundantes. c) Predição da atividade de vias metabólicas enriquecidas pelos metabólitos diferencialmente abundantes em cada tempo de estímulo. Metabólitos significativos foram identificados por *t* teste moderado com o pacote *limma* para linguagem computacional R.

4.5 Dinâmica da resposta metabólica das plaquetas estimuladas com *A. xylosoxidans*.

Para entendermos a dinâmica dos metabólitos diferencialmente abundantes, analisamos o agrupamento hierárquico desses metabólitos ao

longo dos tempos de estímulo da plaqueta com a *A. xylosoxidans* (Fig. 16 a). Nós observamos que *A. xylosoxidans* induziu alterações de alguns clusters de metabólitos que foram distintos ao longo dos tempos de estímulo quando comparados as plaquetas não estimuladas. Outros clusters de metabólitos parecem mudar ao longo dos tempos, mas voltam a ter abundância similar as células não estimuladas.

A predição de vias metabólicas por meio da ferramenta de bioinformática *mumichog* (Li et al.; 2013) revelou que as alterações induzidas pela *A. xylosoxidans* estão relacionadas com o metabolismo de ômega 6, xenobióticos e pirimidina (Fig 16 b). A diferença do metabolismo de pirimidina ao longo do tempo é exemplificada por Desoxitimidina 5 difosfato (dTDP), que tem sua produção diminuída ao longo do tempo de estímulo, sugerindo o uso desse nucleotídeo para possível síntese de moléculas. Em contrapartida, o composto taurodeoxicolato, que exemplifica o metabolismo de ácidos biliares, tem sua secreção aumentada ao longo do tempo.

Figura 16 – Dinâmica da abundância diferencial de metabólitos após estímulo com *A. xylosoxidans*. Plaquetas humanas isoladas foram incubadas com *A. xylosoxidans* (PLT:A.x. 1:10) por 10 min, 2h, 4h ou 8h. O sobrenadante foi coletado e análises foram feitas por LS-MS. a) Representação por heat map dos compostos ionizados ao decorrer do tempo de estímulo das plaquetas com *A. xylosoxidans*. b) Predição das vias metabólicas perturbadas ao longo do tempo de estímulo.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Evidências sugerem que as plaquetas contribuem para diversos processos imunológicos, indo além do seu papel clássico na hemostasia e trombose. As plaquetas interagem com várias células imunes (Ali et al., 2017) e participam de respostas imunes inatas e adaptativas.

Nossos resultados mostram que as plaquetas foram ativadas na presença da *A. xylosoxidans*. A expressão de P selectina é um marcador de ativação plaquetária, armazenada nos grânulos do tipo alfa, e é expressa nas membranas após ativação das plaquetas. Quando a plaqueta ativada sofre degranulação, ocorre mobilização do conteúdo de seus grânulos para o meio extracelular. Além das moléculas de adesão, os grânulos-alfa contêm as quimiocinas e as proteínas microbidas plaquetárias (PMPs), que são liberadas e atuam diretamente contra microrganismos. Portanto, estes dados reforçam a hipótese de que plaquetas liberam PMPs quando em contato com *A. xylosoxidans*, o que inibe seu crescimento.

Ainda, a P selectina é um conector chave para a ligação de plaquetas com monócitos e neutrófilos, via PSGL-1 (Thomas and Storey, 2015). O estudo de Etulain e colaboradores (2015) mostrou que plaquetas ativadas induzem a formação de NETs, por neutrófilos. No entanto, ao adicionar anti-P selectina ou usar plaquetas de camundongos deficientes de P selectina, a formação de NETs foi prejudicada. Portanto, o aumento na expressão de P-selectina sugere que durante a infecção por *A. xylosoxidans* plaquetas também podem interagir com outros leucócitos de forma a ativar mecanismos microbidas importantes contra bactérias extracelulares.

Nossas imagens de microscopia confocal mostraram que as plaquetas incubadas com *A. xylosoxidans* apresentaram formação de pseudópodes. Já se sabe que após ativação, elas passam por uma mudança conformacional e passam a ter uma forma globular com pseudópodes (Fitzgerald et al., 2006). Assim, as análises por microscopia confocal confirmaram também a ativação plaquetária com o estímulo bacteriano. Youseffian e colaboradores também

mostraram por microscopia eletrônica que plaquetas incubadas com *Staphylococcus aureus* apresentaram sinais morfológicos de ativação, como extensão de pseudópodes e OCS dilatados. No entanto, diferente dos nossos resultados, alguns estudos mostram que as plaquetas ativadas são capazes de internalizar bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis* (Youseffian et al 2002; Riaz et al., 2012; Antczak et al., 2010). Kraemer e colaborador não mostraram a internalização, mas sim *clusters* formados por plaquetas agregadas ao redor da *S. aureus*. Trotta e colaboradores mostraram que a bactéria gram-negativa, *Brucella abortus* internaliza as plaquetas, e funciona como carreadora de *B. abortus* para os monócitos, que são infectados com a bactéria.

Nesse estudo verificamos que a plaquetas reduzem o crescimento da *A. xylosoxidans* em dois diferentes tempos de incubação. De forma similar, Ali e colaboradores demonstraram que, após ativação com trombina, plaquetas murinas foram capazes de matar (>40%) *Staphylococcus aureus* resistente à metilcilina (MRSA) em 2h. Ainda, Drago e colaboradores mostraram que o plasma rico em plaquetas (PRP) foi capaz de inibir o crescimento de microorganismos da cavidade oral como *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Plaquetas humanas e murinas podem exercer uma atividade microbicida direta. Ela possui uma variedade de compostos antimicrobicidas liberados em sua ativação. Essas proteínas microbicidas plaquetárias (PMPs) são por exemplo fator plaquetário 4 (PF4), trombocidinas e beta-defensina (hBD). Em sua maioria, as PMPs são quimiocinas exercendo papel antimicrobiano (Nicolai et al., 2019). Krijgsveld e colaboradores mostraram que a trombocidina isolada do grânulo plaquetário, foi capaz de matar *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em até 30 minutos de incubação. Em contrapartida Palankar e colaboradores mostraram que plaquetas não foram capazes de matar *Escherichia coli*. No entanto quando *E. coli* é cultivada com PF4 e IgG anti-PF4/P, a plaqueta apresenta alta capacidade bactericida contra *E. coli*. O PF4 se liga a estrutura A do lipolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas, e o IgG anti-PF4/P se liga

ao PF4 que está cobrindo a bactéria, facilitando o reconhecimento da *E. coli* pela plaqueta e assim sua ação bactericida (Palankar 2017). Brown e McIntyre revelaram que plaquetas estimuladas com LPS secretam micropartículas que contêm IL-1 β maduro recentemente sintetizado, assim como pró IL-1 β . Sugerindo as plaquetas contem a citocina IL-1 β e podem libera-las em resposta ao LPS. Nos achados de Kraemer e colaboradores a *Staphylococcus aureus* tem seu crescimento drasticamente reduzido na presença de plaquetas. No entanto, quando anticorpo anti-hBD-1 é adicionado a cultura de *S. aureus* e plaquetas, a atividade bactericida das plaquetas é significativamente reduzida, evidenciando o efeito microbicida da beta-defensina-1. Desta forma, formulamos a hipótese de que plaquetas produzem PMPs que inibem o crescimento e/ou eliminam *A. xylosoxidans in vitro*.

Também mostramos que o perfil metabólico das plaquetas estimuladas com *A. xylosoxidans* é modificado ao longo dos tempos de incubação quando comparadas com as plaquetas em repouso. E esse tempo de estímulo não é determinante para abundância diferencial da maioria dos metabólitos, e sim e principalmente a presença da bactéria. Chiang e colaboradores também usaram análise metabólicas para compararam o perfil metabólico de plaquetas de pacientes com CAD resistentes a aspirina e plaquetas de pacientes não resistentes. No entanto, diferente de nossos resultados, o perfil metabólico das plaquetas, não mostraram diferença significativa. Gardinassi e colaboradores no estudo integrativo de transcriptômica e metabolômica na infecção controlada de Malária em humanos, da mesma forma, analisaram por metabolômica o perfil metabólico das plaquetas de voluntários saudáveis para confirmar o papel significativo das plaquetas ativadas na tolerância à infecção por *P. vivax*.

Nós também observamos que as principais vias metabólicas enriquecidas ao longo dos tempos de estímulo com *A. xylosoxidans*, foram as vias de biossíntese e ativação de ácido graxos, metabolismo de ômega 6, pirimidina e xenobióticos. A síntese de ácido graxos é regulada positivamente para geração e função de células pró inflamatórias, tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo. Enquanto a oxidação de ácidos graxos preferencialmente é usada por células imunes não inflamatórias e

tolerogênicas, a síntese de ácidos graxos é característica de respostas inflamatórias no sistema imune. (O'Neill et al., 2016). Por exemplo, estudos mostram que macrófagos estimulados com LPS aumentam a síntese de ácidos graxos (Feingold et al., 2012; Posokhova et al., 2007). Outro estudo mostrou que o processo de diferenciação de monócitos iniciadas pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), induziu a regulação positiva de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos. E a síntese de ácidos graxos foi essencial para diferenciação, incluindo desenvolvimento de organelas e filopodia, e função inflamatório dos macrófagos (Ecker et al., 2010). Ainda em macrófagos, a proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2) estimula a via de síntese de ácidos graxos, promovendo a ativação do inflamassoma NLRP3, o que resulta em uma resposta inflamatória prejudicial durante a sepse (Moon et al., 2015). Também, a ativação de DC, via receptor TLR, levou a regulação positiva de ácidos graxos, e esse aumento na síntese de ácidos graxos foi fundamental para a ativação da DC e estimulação das respostas de células TCD8 (Everts et al., 2014). Outro trabalho envolvendo as células T, mostrou que a deleção da acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1), enzima limitadora na síntese de ácido graxos, prejudicou a proliferação e persistências das células T na periferia, assim como foi indispensável para o acúmulo de células TCD8 específicas para antígenos. E esses efeitos foram revertidos ao usar ácidos graxos exógenos nas células T deficientes em ACC1 (Lee et al., 2014). Portanto, em conjunto esses estudos evidenciam que a síntese de ácido graxos tem um papel importante para a função efetora das células do sistema imune, tanto inato quanto adaptativo. Assim, sabendo que as plaquetas também tem um papel no sistema imune, o enriquecimento da via de biossíntese de ácidos graxos nas plaquetas pode estar relacionado com o seu mecanismo de resposta ao patógeno *A. xylosoxidans*.

O trabalho de Majerus e colaboradores de 1969, já mostrou que plaquetas contêm as enzimas necessárias para a síntese de novo de ácidos graxos e também são capazes de transportar ácidos graxos extracelulares para uso como substratos energéticos. Slatter e colaboradores usaram análises lipidômicas para mapear o perfil lipídico das plaquetas em repouso, estimuladas com trombina, ou com ou sem suplementação de aspirina *in vivo*.

O perfil lipídico das plaquetas ativadas por trombina apresentou 86% de lipídios ausentes nas plaquetas em repouso, e dentro de todos os lipídios regulados positivamente, os mais predominantes foram identificados como ácidos graxos e glicerolfosfolipídeos. Eles mostraram que ativação da fosfolipase citosólica A₂, dependente de trombina, mobiliza os ácidos graxos como substrato para produção energética mitocondrial, via acetil CoA. Quando a geração de energia foi bloqueada (via glicólise e inibição da beta-oxidação), os níveis de ácidos graxos caíram devido à inibição de sua geração e não ao aumento do consumo. Isso revela um ciclo de feedback positivo em que a própria geração de ácidos graxos requer energia. Assim, talvez no nosso estudo as plaquetas apresentam a via biossíntese de ácido graxos perturbada, por estarem ativadas e para suportar o aporte energético mitocondrial, e também retroalimentando a produção do próprio ácido graxo. Outro estudo correlacionou metabolismo de plaquetas e bioenergética. Chacko e colaboradores, mostraram que durante o stress oxidativo induzido em plaquetas, 89 metabolitos foram alterados e as predominantemente enriquecidas foram as vias de pirimidina, glicólise e gliconeogênese e novo ácidos graxos. Indicando que essas vias metabólicas estão correlacionadas ao funcionamento mitocondrial.

Para avaliar a dinâmica dos metabolitos diferentemente abundantes, analisamos o agrupamento hierárquico dos metabolitos ao longo dos tempos de estímulo com a bactéria. Percebemos que alguns cluster de metabólitos são distintos ao longo dos tempos de estímulo quando comparando com as plaquetas não estimuladas. E, a predição de vias metabólicas revelou que as alterações induzidas pela *A. xylosoxidans* estão relacionadas com o metabolismo de ômega 6, xenobióticos e pirimidina.

As pirimidinas desempenham funções essenciais no metabolismo humano como bases de ribonucleotídeos no RNA (uracila e citosina) e como bases de desoxirribonucleotídeos no DNA (citosina e timina). Além de seu papel fundamental na biossíntese de ácidos nucleicos, são necessários para o metabolismo de carboidratos e lipídios (Okesli et al., 2017; Loffler et al., 2005). A diferença do metabolismo de pirimidina ao longo do tempo é exemplificada por Desoxitimidina 5 difosfato (dTDP). Ao longo do tempo, essa molécula diminui consideravelmente, sugerindo seu uso para composição de moléculas

ou por outras vias metabólicas.

Em conjunto, nossos dados mostram que a plaquetas reagiram a presença da *A. xylosoxidans*, sendo ativadas e inibindo o crescimento da bactéria. O perfil metabólico das plaquetas também apresentou alterações na presença da bactéria.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

As plaquetas são ativadas na presença da *A. xylosoxidans*, e são capazes de inibir o crescimento bacteriano.

O perfil metabólico das plaquetas é modificado ao estimular as plaquetas com *A. xylosoxidans*, e as vias metabólicas enriquecidas são ácidos graxos, xenobióticos e pirimidina.

REFERÊNCIAS

Angénieux, C., Dupuis, A., Gachet, C., de la Salle, H., and Maître, B. (2019). Cell surface expression of HLA I molecules as a marker of young platelets. *J Thromb Haemost* 17, 1511–1521.

Alexander, C., Rietschel, E.T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 7, 167-202.

Ali, R.A., Wuescher, L.M., Dona, K.R., and Worth, R.G. (2017). Platelets mediate host-defense against *S. aureus* through direct bactericidal activity and by enhancing macrophage activities. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 198, 344–351.

Amoureux, L., Bador, J., Fardeheb, S., Mabile, C., Couchot, C., Massip, C., Salignon, A.-L., Berlie, G., Varin, V., and Neuwirth, C. (2013). Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in Hospital, Domestic, and Outdoor Environmental Samples and Comparison with Human Clinical Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7142–7149.

Anand, X., S., Viles-Gonzalez, J., Badimon, J., Cavusoglu, E., and Marmur, J. (2003). Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost* 90, 377–384.

Antczak, A.J., Vieth, J.A., Singh, N., and Worth, R.G. (2011). Internalization of IgG-Coated Targets Results in Activation and Secretion of Soluble CD40 Ligand and RANTES by Human Platelets. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 210–216.

Aslam, R., Speck, E.R., Kim, M., Crow, A.R., Bang, K.W.A., Nestel, F.P., Ni, H., Lazarus, A.H., Freedman, J., and Semple, J.W. (2006). Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo. *107*, 5.

Assinger, A., Laky, M., Schabbauer, G., Hirschl, A.M., Buchberger, E., Binder, B.R., and Volf, I. (2011). Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2: Plasma and platelets enhance clearance of bacteria. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9, 799–809.

Bador, J., Amoureux, L., Blanc, E., and Neuwirth, C. (2013). Innate Aminoglycoside Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* Is Due to AxyXY-OprZ, an RND-Type Multidrug Efflux Pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 603–605.

Bakogiannis, C., Sachse, M., Stamatelopoulos, K., and Stellos, K. (2019). Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine* 122, 154157.

Berthet, J., Damien, P., Hamzeh-Cognasse, H., Arthaud, C.-A., Eyraud, M.-A., Zéni, F., Pozzetto, B., McNicol, A., Garraud, O., and Cognasse, F. (2012). Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clinical Immunology* 145, 189–200.

- Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews* 23, 177–189.
- Blann, A. (2003). The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European Heart Journal* 24, 2166–2179.
- Brown, A.J., Sepuru, K.M., Sawant, K.V., and Rajarathnam, K. (2017). Platelet-Derived Chemokine CXCL7 Dimer Preferentially Exists in the Glycosaminoglycan-Bound Form: Implications for Neutrophil–Platelet Crosstalk. *Front. Immunol.* 8, 1248.
- Brown, G.T., and McIntyre, T.M. (2011). Lipopolysaccharide Signaling without a Nucleus: Kinase Cascades Stimulate Platelet Shedding of Proinflammatory IL-1 β -Rich Microparticles. *J.I.* 186, 5489–5496.
- Byrne, M.F., Kerrigan, S.W., Corcoran, P.A., Atherton, J.C., Murray, F.E., Fitzgerald, D.J., and Cox, D.M. (2003). *Helicobacter pylori* binds von Willebrand factor and interacts with GPIb to induce platelet aggregation. *Gastroenterology* 124, 1846–1854.
- Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture, S., Yui, K., Topham, D.J., Baldwin, W.M., and Morrell, C.N. (2012). Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. *J.I.* 189, 916–923.
- Chacko, B.K., Smith, M.R., Johnson, M.S., Benavides, G., Culp, M.L., Pilli, J., Shiva, S., Uppal, K., Go, Y.-M., Jones, D.P., et al. (2019). Mitochondria in precision medicine; linking bioenergetics and metabolomics in platelets. *Redox Biology* 22, 101165.
- Chiang, J.-Y., Lee, S.-H., Chen, Y.-C., Wu, C.-K., Chuang, J.-Y., Lo, S.-C., Yeh, H.-M., Yeh, S.-F.S., Hsu, C.-A., Lin, B.-B., et al. (2019). Metabolomic Analysis of Platelets of Patients With Aspirin Non-Response. *Front. Pharmacol.* 10, 1107.
- Claassen, S.L., Reese, J.M., Mysliwiec, V., and Mahlen, S.D. (2011). *Achromobacter xylosoxidans* Infection Presenting as a Pulmonary Nodule Mimicking Cancer : Table 1. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2751–2754.
- Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Delezay, O., Pozzetto, B., McNicol, A., and Garraud, O. (2008). Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br. J. Haematol.* 141, 84–91.
- Cui, L., Lee, Y.H., Thein, T.L., Fang, J., Pang, J., Ooi, E.E., Leo, Y.S., Ong, C.N., and Tannenbaum, S.R. (2016). Serum Metabolomics Reveals Serotonin as a Predictor of Severe Dengue in the Early Phase of Dengue Fever. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004607.
- Cui, L., Lee, Y.H., Kumar, Y., Xu, F., Lu, K., Ooi, E.E., Tannenbaum, S.R., and Ong, C.N. (2013). Serum Metabolome and Lipidome Changes in Adult Patients with Primary Dengue Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2373.
- Kaushansky, K. (2006). Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *N Engl J Med* 354, 2034–2045.
- Kawai, Y., Nakagawa, Y., Matuyama, T., Akagawa, K., Itagawa, K., Fukase, K., Kusumoto, S., Nishijima, M., and Yano, I. (1999). A typical bacterial ornithine-

containing lipid $N^{\pm}$ -(d)-[3-(hexadecanoyloxy)hexadecanoyl]-ornithine is a strong stimulant for macrophages and a useful adjuvant. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 23, 67–73.

Kawai, Y., Takasuka, N., Inoue, K., Akagawa, K., and Nishijima, M. (2000). Ornithine-containing lipids stimulate CD14-dependent TNF- $\hat{1}\pm$ production from murine macrophage-like J774.1 and RAW 264.7 cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 28, 197–203.

Kho, S., Barber, B.E., Johar, E., Andries, B., Poespoprodjo, J.R., Kenangalem, E., Piera, K.A., Ehmann, A., Price, R.N., William, T., et al. (2018). Platelets kill circulating parasites of all major Plasmodium species in human malaria. *Blood* 2018-05-849307.

Kao, K., Cook, D., and Scornik, J. (1986). Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood* 68, 627–632.

DeBerardinis, R.J., and Thompson, C.B. (2012). Cellular Metabolism and Disease: What Do Metabolic Outliers Teach Us? *Cell* 148, 1132–1144.

Derber, C., Elam, K., Forbes, B.A., and Bearman, G. (2011). *Achromobacter* species endocarditis: A Case Report and Literature Review.

Drago, L., Bortolin, M., Vassena, C., Taschieri, S. & Del Fabbro, M. (2013). Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiology* 13, 47.

Duggan, J.M., Goldstein, S.J., Chenoweth, C.E., Kauffman, C.A., and Bradley, S.F. (1996). *Achromobacter xylosoxidans* Bacteremia: Report of Four Cases and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases* 23, 569–576.

Ecker, J., Liebisch, G., Englmaier, M., Grandl, M., Robenek, H., and Schmitz, G. (2010). Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 7817–7822.

Elzey, B.D., Tian, J., Jensen, R.J., Swanson, A.K., Lees, J.R., Lentz, S.R., Stein, C.S., Nieswandt, B., Wang, Y., Davidson, B.L., et al. Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity: A Communication Link between Innate and Adaptive Immune Compartments. 11.

Etulain, J., Martinod, K., Wong, S.L., Cifuni, S.M., Schattner, M., and Wagner, D.D. (2015). P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* 126, 242–246.

Evangelista, V., Manarini, S., Di Santo, A., Capone, M.L., Ricciotti, E., Di Francesco, L., Tacconelli, S., Sacchetti, A., D'Angelo, S., Scilimati, A., et al. (2006). De Novo Synthesis of Cyclooxygenase-1 Counteracts the Suppression of Platelet Thromboxane Biosynthesis by Aspirin. *Circulation Research* 98, 593–595.

Everts, B., Amiel, E., Huang, S.C.-C., Smith, A.M., Chang, C.-H., Lam, W.Y., Redmann, V., Freitas, T.C., Blagih, J., van der Windt, G.J.W., et al. (2014). TLR-driven early

glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol* 15, 323–332.

Fiehn, O. (2001). Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comparative and Functional Genomics* 2, 155–168.

Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., and Cox, D. (2006). The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 4, 445–457.

Flaumenhaft, R., and Sharda, A. (2019). Platelet Secretion. In *Platelets*, (Elsevier), pp. 349–370.

Feingold, K.R., Shigenaga, J.K., Kazemi, M.R., McDonald, C.M., Patzek, S.M., Cross, A.S., Moser, A., and Grunfeld, C. (2012). Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 92, 829–839.

Fox, J.M., Kausar, F., Day, A., Osborne, M., Hussain, K., Mueller, A., Lin, J., Tsuchiya, T., Kanegasaki, S., and Pease, J.E. (2018). CXCL4/Platelet Factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration. *Sci Rep* 8, 9466.

Gardinassi, L.G., Cordy, R.J., Lacerda, M.V.G., Salinas, J.L., Monteiro, W.M., Melo, G.C., Siqueira, A.M., Val, F.F., Tran, V., Jones, D.P., et al. (2017a). Metabolome-wide association study of peripheral parasitemia in *Plasmodium vivax* malaria. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 307, 533–541.

Gardinassi, L.G., Xia, J., Safo, S.E., and Li, S. (2017b). Bioinformatics Tools for the Interpretation of Metabolomics Data. *Curr. Pharmacol. Rep.* 3, 374–383.

Gardinassi, L.G., Arévalo-Herrera, M., Herrera, S., Cordy, R.J., Tran, V., Smith, M.R., Johnson, M.S., Chacko, B., Liu, K.H., Darley-Usmar, V.M., et al. (2018). Integrative metabolomics and transcriptomics signatures of clinical tolerance to *Plasmodium vivax* reveal activation of innate cell immunity and T cell signaling. *Redox Biol.* 17, 158–170.

Ghasemzadeh, M., Kaplan, Z.S., Alwis, I., Schoenwaelder, S.M., Ashworth, K.J., Westein, E., Hosseini, E., Salem, H.H., Slaterry, R., McColl, S.R., et al. (2013). The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. *Blood* 121, 4555–4566.

Gomez-Cerezo, J., Surez, I., Ros, J.J., Pea, P., Garca de Miguel, M.J., de Jos, M., Monteagudo, O., Linares, P., Barbado-Cano, A., and Vzquez, J.J. (2003). *Achromobacter xylosoxidans* Bacteremia: A 10-Year Analysis of 54 Cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22, 360–363.

Grewal, I.S., Flavell RA. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16, 111-35.

Gremmel, T., Frelinger, A., and Michelson, A. (2016). Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 42, 191–204.

Gutmann, C., Joshi, A., and Mayr, M. (2020). Platelet “-omics” in health and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 307, 87–96.

Hansen, C.R., Pressler, T., Nielsen, K.G., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., and Høiby, N. (2010). Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 9, 51–58.

Hansen, C.R., Pressler, T., Nielsen, K.G., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., and Høiby, N. (2010). Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 9, 51–58.

Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. (1993). *Blood Rev.* 7, 52-62.

Harting, H.J. (2007). *The Platelet cytoskeleton*. Academic Press. 75-97.

Henn, V., Slupsky, J.R., Gräfe, M., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Müller-Berghaus, G., and Kroczeck, R.A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591–594.

Hoffman, M. (2003). A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews* 17, S1–S5.

Hu, X., Chen, Z., Xiong, K., Wang, J., Rao, X., and Cong, Y. (2017). Vi capsular polysaccharide: Synthesis, virulence, and application. *Critical Reviews in Microbiology* 43, 440–452.

Hundelshausen, P. von, Weber, K.S.C., Huo, Y., Proudfoot, A.E.I., Nelson, P.J., Ley, K., and Weber, C. (2001). RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation*.

Hutchison, M.L., Bonell, E.C., Poxton, I.R., and Govan, J.R.W. (2000). Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 27, 73–77.

Hyodo, S., Katahira, S., and Shigeta, S. (1982). Experimental Infection of Immunocompromised Mice with *Achromobacter xylosoxidans*. *Tohoku J. Exp. Med.* 136, 251–261.

Italiano, J.E., Lecine, P., Shivdasani, R.A., and Hartwig, J.H. (1999). Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *J. Cell Biol.* 147, 1299–1312.

Jennings, L. (2009). Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 102, 248–257.

Kraemer, B.F., Campbell, R.A., Schwertz, H., Cody, M.J., Franks, Z., Tolley, N.D., Kahr, W.H.A., Lindemann, S., Seizer, P., Yost, C.C., et al. (2011). Novel Anti-bacterial Activities of β -defensin 1 in Human Platelets: Suppression of Pathogen Growth and Signaling of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *PLOS Pathog.* 7, e1002355.

Krijgsveld, J., Zaat, S.A.J., Meeldijk, J., van Veelen, P.A., Fang, G., Poolman, B., Brandt, E., Ehlert, J.E., Kuijpers, A.J., Engbers, G.H.M., et al. (2000). Thrombocidins, Microbicidal Proteins from Human Blood Platelets, Are C-terminal Deletion Products of CXC Chemokines. *Journal of Biological Chemistry* 275, 20374–20381.

- Lee, J., Walsh, M.C., Hoehn, K.L., James, D.E., Wherry, E.J., and Choi, Y. (2014). Regulator of Fatty Acid Metabolism, Acetyl Coenzyme A Carboxylase 1, Controls T Cell Immunity. *J.I.* 192, 3190–3199.
- Lepropre, S., Kautbally, S., Octave, M., Ginion, A., Onselaer, M.-B., Steinberg, G.R., Kemp, B.E., Hego, A., Wéra, O., Brouns, S., et al. (2018). AMPK-ACC signaling modulates platelet phospholipids and potentiates thrombus formation. *Blood* 132, 1180–1192.
- Li, S., Todor, A., and Luo, R. (2016). Blood transcriptomics and metabolomics for personalized medicine. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14, 1–7.
- Li, S., Park, Y., Duraisingham, S., Strobel, F.H., Khan, N., Soltow, Q.A., Jones, D.P., and Pulendran, B. (2013). Predicting network activity from high throughput metabolomics. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003123
- Lindmark, E., Tenno, T., and Siegbahn, A. (2000). Role of Platelet P-Selectin and CD40 Ligand in the Induction of Monocytic Tissue Factor Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2322–2328.
- Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *Journal of Cell Biology* 154, 485–490.
- Lefrançois, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D.M., Thornton, E.E., Headley, M.B., David, T., Coughlin, S.R., et al. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544, 105–109.
- Legrand C., Anaissie, E. (1992). Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in Patients with Cancer: *Clinical Infectious Diseases* 14, 479–484.
- Loffler, M., Fairbanks, L., Zameitat, E., Marinaki, A., and Simmonds, H. (2005). Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 11, 430–437.
- Lourbakos, A., Yuan, Y., Jenkins, A.L., Travis, J., Andrade-Gordon, P., Santulli, R., Potempa, J., and Pike, R.N. (2001). Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* 97, 3790–3797.
- Machlus, K.R., and Italiano, J.E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 201, 785–796.
- Majerus, P.W., Smith, M.B., and Clamon, G.H. (1969). Lipid metabolism in human platelets. *J. Clin. Invest.* 48, 156–164.
- Man, K., Kutyavin, V.I., and Chawla, A. (2017). Tissue Immunometabolism: Development, Physiology, and Pathobiology. *Cell Metabolism* 25, 11–26.
- McMorran, B.J., Marshall, V.M., de Graaf, C., Drysdale, K.E., Shabbar, M., Smyth, G.K., Corbin, J.E., Alexander, W.S., and Foote, S.J. (2009). Platelets kill

intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* 323, 797–800.

McMorran, B.J., Wieczorski, L., Drysdale, K.E., Chan, J.-A., Huang, H.M., Smith, C., Mitiku, C., Beeson, J.G., Burgio, G., and Foote, S.J. (2012). Platelet Factor 4 and Duffy Antigen Required for Platelet Killing of *Plasmodium falciparum*. *Science* 338, 1348–1351.

Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T., and Hwa, J. (2019). Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Front. Cardiovasc. Med.* 6, 153.

Moon, J.-S., Lee, S., Park, M.-A., Siempos, I.I., Haslip, M., Lee, P.J., Yun, M., Kim, C.K., Howrylak, J., Ryter, S.W., et al. (2015). UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *J. Clin. Invest.* 125, 665–680.

Nicolai, L., Gaertner, F., and Massberg, S. (2019). Platelets in Host Defense: Experimental and Clinical Insights. *Trends in Immunology* 40, 922–938.

Nishat, S., Wuescher, L.M., and Worth, R.G. (2018). Platelets Enhance Dendritic Cell Responses against *Staphylococcus aureus* through CD40-CD40L. *Infect Immun* 86, e00186-18, /iai/86/9/e00186-18.atom.

Nocella, C., Carnevale, R., Bartimoccia, S., Novo, M., Cangemi, R., Pastori, D., Calvieri, C., Pignatelli, P., and Violi, F. (2017). Lipopolysaccharide as trigger of platelet aggregation via eicosanoid over-production. *Thromb Haemost* 117, 1558–1570.

Okesli, A., Khosla, C., and Bassik, M.C. (2017). Human pyrimidine nucleotide biosynthesis as a target for antiviral chemotherapy. *Current Opinion in Biotechnology* 48, 127–134.

Okuda, S., Sherman, D.J., Silhavy, T.J., Ruiz, N., and Kahne, D. (2016). Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model. *Nat Rev Microbiol* 14, 337–345.

O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 16, 553–565.

Palankar, R., Kohler, T.P., Krauel, K., Wesche, J., Hammerschmidt, S., and Greinacher, A. (2018). Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via platelet factor 4 and Fcγ RIIA. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 16, 1187–1197.

Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2013). Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity* 38, 633–643.

Posokhova, E.N., Khoshchenko, O.M., Chasovskikh, M.I., Pivovarova, E.N., and Dushkin, M.I. (2008). Lipid synthesis in macrophages during inflammation in vivo: Effect of agonists of peroxisome proliferator activated receptors α and γ and of retinoid X receptors. *Biochemistry Moscow* 73, 296–304.

Prado, M.K.B., Locachevic, G.A., Zoccal, K.F., Paula-Silva, F.W.G., Fontanari, C., Ferreira, J.C., Pereira, P.A.T., Gardinassi, L.G., Ramos, S.G., Sorgi, C.A., et al. (2017). Leukotriene B₄ is essential for lung host defence and alpha-defensin-1 production during *Achromobacter xylosoxidans* infection. *Sci. Rep.* 7, 17658.

Ravi, S., Chacko, B., Sawada, H., Kramer, P.A., Johnson, M.S., Benavides, G.A., O'Donnell, V., Marques, M.B., and Darley-Usmar, V.M. (2015). Metabolic Plasticity in Resting and Thrombin Activated Platelets. *PLoS ONE* 10, e0123597.

Reddy, A.K., Garg, P., Shah, V., and Gopinathan, U. (2009). Clinical, microbiological profile and treatment outcome of ocular infections caused by *Achromobacter xylosoxidans*. *Cornea* 28, 1100–1103.

Reed, G.L. (2007). Platelet secretion. *Academic Press*. 309-18.

Rendu, F., and Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12, 261–273.

Reverdy, M.E., Freney, J., Fleurette, J., Coulet, M., Surgot, M., Marmet, D., and Ploton, C. (1984). Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans*. *Journal of Clinical Microbiology* 19, 140–143.

Riaz, A.H., Tasma, B.E., Woodman, M.E., Wooten, R.M., and Worth, R.G. (2012). Human platelets efficiently kill IgG-opsonized *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 78–83.

Roberts, I.S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 285–315.

Rumbaut RE, Thiagarajan P. (2010). Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. *Morgan & Claypool Life Sciences*. 479–484

Schwartz, H., Tolley, N.D., Foulks, J.M., Denis, M.M., Risenmay, B.W., Buerke, M., Tilley, R.E., Rondina, M.T., Harris, E.M., Kraiss, L.W., et al. (2006). Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *Journal of Experimental Medicine* 203, 2433–2440.

Semple, J.W., Italiano, J.E., and Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 264–274.

Shiraki, R., Inoue, N., Kawasaki, S., Takei, A., Kadotani, M., Ohnishi, Y., Ejiri, J., Kobayashi, S., Hirata, K., Kawashima, S., et al. (2004). Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis Research* 113, 379–385.

Slatter, D.A., Aldrovandi, M., O'Connor, A., Allen, S.M., Brasher, C.J., Murphy, R.C., Mecklemann, S., Ravi, S., Darley-Usmar, V., and O'Donnell, V.B. (2016). Mapping the Human Platelet Lipidome Reveals Cytosolic Phospholipase A2 as a Regulator of Mitochondrial Bioenergetics during Activation. *Cell Metabolism* 23, 930–944.

Spencer F.A., Becker R.C. (1997). Platelets: Structure, Function, and Their Fundamental Contribution to Hemostasis and Pathologic Thrombosis. *Coronary Thrombosis and Thrombolysis* 193, 31-49

Stahl, A. -I. (2006). Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood* 108, 167–176.

Steimle, A., Autenrieth, I.B., and Frick, J.-S. (2016). Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 306, 290–301.

Scheuerer, B., Ernst, M., Dürbaum-Landmann, I., Fleischer, J., Grage-Griebenow, E., Brandt, E., Flad, H.D., and Petersen, F. (2000). The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 95, 1158–1166.

Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics* 7, 128–139.

Swenson, C.E., and Sadikot, R.T. (2015). *Achromobacter* respiratory infections. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 252–258.

Roberts, L.D., Souza, A.L., Gerszten, R.E., and Clish, C.B. (2012). Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology* 98.

Thomas, M., and Storey, R. (2015). The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost* 114, 449–458.

Trotta, A., Velásquez, L.N., Milillo, M.A., Delpino, M.V., Rodríguez, A.M., Landoni, V.I., Giambartolomei, G.H., Pozner, R.G., and Barrionuevo, P. (2018). Platelets Promote *Brucella abortus* Monocyte Invasion by Establishing Complexes With Monocytes. *Front. Immunol.* 9.

Yabuuchi, E., and Ohyama, A. (1971). *Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from Human Ear Discharge. *Japanese Journal of Microbiology* 15, 477–481

Yabuuchi, E., Kawamura, Y., Kosako, Y., and Ezaki, T. (1998). Emendation of Genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and Proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) Comb. Nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) Comb. Nov., and *Achromobacter xylosoxidans* Subsp. de. *Microbiology and Immunology* 42, 429–438.

Yeaman, M.R. (2014). Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol* 12, 426–437.

Youssefian, T., Drouin, A., Massé, J.-M., Guichard, J., and Cramer, E.M. (2002). Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 99, 4021–4029.

Yu, T., Park, Y., Johnson, J.M., and Jones, D.P. (2009). apLCMS--adaptive processing of high-resolution LC/MS data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1930–1936.

Weyrich, A.S., Schwartz, H., Kraiss, L.W., and Zimmerman, G.A. (2009). Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, 241–246.

Weyrich, A.S., Dixon, D.A., Pabla, R., Elstad, M.R., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1998). Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 5556–5561.

Weyrich, A.S., Elstad, M.R., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Morrissey, J.H., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1996). Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97, 1525–1534.

White, J.G. (1979). Current Concepts of Platelet Structure. *Am J Clin Pathol* 71, 363–378.

White J.G. (1968). Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. *Blood* 31, 604-22.

White J.G. (2007). Platelet structure. Academic Press. 45-73.

Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2008). Signal-Dependent Protein Synthesis by Activated Platelets: New Pathways to Altered Phenotype and Function. *ATVB* 28.

Zimring, J.C., Slichter, S., Odem-Davis, K., Felcyn, J.R., Kapp, L.M., Bell, L.N., Gunst, P.R., Corson, J., Jones, M.K., Pellham, E., et al. (2016). Metabolites in stored platelets associated with platelet recoveries and survivals: METABOLITES ASSOCIATED WITH PLT STORAGE. *Transfusion* 56, 1974–1983.

Zufferey, A., Schvartz, D., Nolli, S., Reny, J.L., Sanchez, J.C., Fontana, P. (2014). Characterization of the platelet granule proteome: evidence of the presence of MHC1 in alpha-granules. *J Proteomics* 101, 130-40.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 027/2019
kms

Ribeirão Preto, 14 de junho de 2019.

À pesquisadora
Marcella Roverato Pastore
Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o protocolo de pesquisa intitulado “**Função e Perfil metabólico de plaquetas na infecção experimental por *Achromobacter xylosoxidans***” (CAAE: 06825118.0.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº 496), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em sua 188ª reunião, realizada em 12/06/2019, conforme Parecer Consubstanciado nº 3.393.200.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
Coordenadora do CEP/FCFRP