

DANILO SASSO AUGUSTO

O papel das amastinas na ativação do inflamassoma e na manutenção da estabilidade dos vacúolos ocupados por *Leishmania braziliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni.

RIBEIRÃO PRETO, 2019

DANILO SASSO AUGUSTO

O papel das amastinas na ativação do inflamassoma e na manutenção da estabilidade dos vacúolos ocupados por *Leishmania braziliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni.

RIBEIRÃO PRETO, 2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data: __/__/____

FICHA CATALOGRÁFICA

AUGUSTO, Danilo Sasso

O papel das amastinas na ativação do inflamassoma e na manutenção da estabilidade dos vacúolos ocupados por *Leishmania braziliensis*/ Danilo Sasso Augusto; Orientador: Prof. Dr Dario Simões Zamboni – Ribeirão Preto 2019.

65f

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo 2019

1.Leishmaniose 2.Inflamassoma 3.Amastinas 4.Vacúolo 5.Imunidade inata

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: AUGUSTO, Danilo Sasso

Título: O papel das amastinas na ativação do inflamassoma e na manutenção da estabilidade dos vacúolos ocupados por *Leishmania braziliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: __ / __ / __

Banca Examinadora

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Munira Muhammad Abdel Baqui

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Julgamento: _____

Assinatura: _____

A tudo e a todos de quem faço parte
e que fazem parte de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a meus pais, Carlos e Rosana, por não deixarem nunca meus sonhos morrerem, e junto deles, a esperança de que seus filhos construam uma humanidade mais humana. Aos meus irmãos, Roger e Ana Carla, por me ensinarem que galhos de uma mesma árvore seguem diferentes rumos, produzem diferentes frutos, mas nunca perdem suas origens.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dario, pelo exemplo de otimismo, liderança e por me permitir trabalhar e me desenvolver em seu grupo ao longo desse trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Leonardo, Gustavo, Warrisom, Renan, Augusto, Keyla, Alexandre, Luiza, Catarina, Robson, Letícia, Djalma, Ana Luisa, Victória, Natalia, pelos excelentes momentos juntos e pela grande ajuda na bancada e na teoria. O trabalho em grupo fez essa dissertação. Além dos amigos do laboratório, agradeço aos amigos da vida que sempre me ouviram e me apoiaram nessa empreitada, Bruce, Moto, Yoshi, Baio, Toddy, Binho, Gabi, Xandão, Tila, Bala, Ted, Trala, Piu-piu, Murilão e a turma do futebol. E a Nathália por todo apoio e carinho.

Agradeço ao Domingos, a Adriana, ao Rubilan, ao Edir, ao Júlio, à Denise e, especialmente, à Maira, por todo o suporte técnico em nosso laboratório e no prédio central. Agradeço à Gabriela, da secretaria, por todo auxílio, mesmo “me passando” um dos maiores sustos do meu mestrado.

Agradeço a FAPESP, CRID/FAPESP, INCTV/CNPq, CAPES e ao programa de Biologia Celular e Molecular, pelo apoio financeiro. E agradeço a Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela estrutura e por proporcionar uma formação acadêmica de qualidade.

“Nós falhamos mais frequentemente porque nós solucionamos o problema errado, do que por obtermos a solução errada para o problema certo.” – Russell L. Ackoff

RESUMO

AUGUSTO, D. S. **O papel das amastinas na ativação do inflamassoma e na manutenção da estabilidade dos vacúolos ocupados por *Leishmania braziliensis*.** 2019, 65f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que afeta, atualmente, cerca de 12 milhões de pessoas, causando desde lesões ulcerosas na pele a mortes. O ciclo de vida dos parasitas de *Leishmania* spp., o agente etiológico da leishmaniose, se divide entre o sistema digestório de vetor flebotomíneo e nos tecidos de mamíferos, dentro de vacúolos de fagócitos profissionais, principalmente em macrófagos. Recentemente, demonstrou-se a ação do inflamassoma de Nlrp3, um complexo celular citoplasmático de alto peso molecular relacionado à resposta inflamatória a danos e patógenos, em infecção por parasitas de *Leishmania* spp., gerando IL-1 β e NO, e ativando respostas microbidas e inflamatórias. Paralelamente, foi verificada a existência de uma maquinaria intracelular de RNAi em *Leishmania braziliensis*, o que possibilitou o silenciamento e o estudo do papel das amastinas, uma grande família de glicoproteínas de superfície expressas em amastigotos de *Leishmania* spp. relacionadas à adesão entre a membrana de amastigotos com a membrana interna dos vacúolos parasitóforos. Este trabalho visa compreender como ocorre a resposta do inflamassoma de Nlrp3 frente a uma infecção com parasitos de *L. braziliensis* com amastinas silenciadas. Macrófagos infectados com parasitos com expressão silenciada das amastinas apresentaram maior ativação de caspase-1 e liberação de IL-1 β dependente do inflamassoma de Nlrp3 quando comparados a macrófagos infectados com parasitos selvagens ou com expressão

reconstituída das amastinas. Macrófagos *Casp11^{-/-}* e *Nlrc4^{-/-}* apresentaram redução na produção total de IL-1 β em infecções por *L. braziliensis*. No entanto, essas moléculas não estão envolvidas diretamente com o aumento específico da liberação de IL-1 β em infecções por parasitos com expressão irregular de amastinas. Visando compreender como a ausência das amastinas induz uma maior ativação dos inflamassomas, foi realizada uma imunofluorescência de macrófagos infectados, utilizando um anticorpo específico para Galectina-3, que indica lise de vacúolos. Tais experimentos elucidaram a atuação das amastinas na manutenção da estabilidade vacuolar, de forma que macrófagos infectados por parasitos com expressão deficiente de amastina apresentaram uma quantidade muito maior de eventos de lise de vacúolo quando comparados a macrófagos infectados com parasitos com expressão reconstituída de amastinas. Por fim, foi constatado quem, em infecção por *L. braziliensis*, a Galectina-3 possui um papel na intensificação da ativação de Nlrp3 independente da presença ou ausência das amastinas. Em conjunto, os experimentos realizados suportam a hipótese de que as amastinas estejam correlacionadas a manutenção da estabilidade do vacúolo. Possivelmente, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) estão sendo liberados no citoplasma de macrófagos infectados pelas linhagens de expressão silenciada para as amastinas. Possivelmente tais PAMPs são reconhecidos por receptores da imunidade inata, induzindo efluxo de potássio e consequente maior ativação de Nlrp3.

Palavras-chave: amastinas, *Leishmania braziliensis*, vacúolo.

ABSTRACT

AUGUSTO, D. S. **The role of amastins in inflammasome activation and stability of vacuoles infected by *Leishmania braziliensis***. 2019, 64f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

Leishmaniasis is a neglected tropical disease. Currently, about 12 million people are affected, suffering from ulcerated skin lesions to deaths. Part of the life cycle of *Leishmania* spp. parasites, the etiological agent of leishmaniasis, occurs in the digestive system of phlebotomine vector and part occurs in mammalian tissue, within the vacuoles of phagocytic cells. Recently, the inflammatory response of Nlrp3, a high molecular weight cytoplasmic cell complex related to the inflammatory response to damage and pathogens, was elucidated in infection by *Leishmania* spp. parasites, generating IL-1 β and NO, which have microbicidal and inflammatory responses. With the validation of the intracellular machinery of RNAi in *Leishmania braziliensis*, it was possible to silence and study the role of amastins, a family of surface glycoproteins expressed in amastigotes of *Leishmania* spp. related to the adhesion between the amastigote membrane and the internal membrane of the parasitophorous vacuoles. This work aims to understand the response of the inflammasome to an infection with *L. braziliensis* parasites with silenced amastins. Macrophages infected with parasites with silenced expression of amastins showed greater activation of caspase-1 and release of IL-1 β dependent on the activation of Nlrp3 when compared to macrophages infected with wild parasites or with reconstituted amastine expression. *Caspase-11*^{-/-} and *Nlrc4*^{-/-} macrophages showed reduction in total IL-1 β production in *L. braziliensis* infections. However, such inflammasomes are not directly involved in the specific increase of IL-

1 β release in infections by parasites with irregular expression of amastins. Aiming to understand how the absence of amastin induces a greater activation of inflammasomes, an immunofluorescence of infected macrophages was performed using a galectin-3 specific antibody, a marker of vacuole lysis. These experiments elucidated the role of amastins on the maintenance of vacuolar stability, so that macrophages infected by parasites with amastins deficient expression presented a much larger number of vacuole lysis events when compared to macrophages infected with parasites with reconstituted expression of amastins. Finally, it was found that in *L. braziliensis* infection, galectin-3 plays a role in the enhancement of Nlrp3 activation regardless of the presence or absence of amastins. From the experiments it is possible to conclude that the amastins are correlated to the maintenance of the stability of the vacuole so that possibly molecular patterns associated with pathogens (PAMPs) are being released in the cytoplasm of macrophages infected by the strains with silenced expression of amastins. Possibly such PAMPs are recognized by receptors of innate immunity, inducing potassium efflux and consequent greater activation of Nlrp3.

Keywords: Amastins, *Leishmania braziliensis*, vacuole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parasitos δ -amastinas-RNAi induzem maior secreção de IL-1 β comparados aos selvagens.	22
Figura 2. Parasitos δ -amastinas-RNAi induzem maior ativação de IL-1 β comparados ao clone com expressão reconstituída de amastina..	23
Figura 3. Parasitos δ -amastinas-RNAi induzem maior ativação de caspase-1.	25
Figura 4. Parasitos δ -amastinas-RNAi não ativam caspase-1 em animais <i>Nlrp3</i> ^{-/-}	26
Figura 5. Caspase-11 atua na liberação total de IL-1 β , mas não nas diferenças entre as infecções pelas linhagens com diferentes padrões de expressão das δ -amastinas.....	27
Figura 6. Nlrc4 atua na liberação total de IL-1 β , mas não nas diferenças induzidas pelas linhagens com diferentes perfis de expressão de δ -amastinas..	28
Figura 7. <i>L. braziliensis</i> induz a formação de agregados de Galectina-3.	30
Figura 8. As amastinas de <i>L. braziliensis</i> estão correlacionadas com a integridade vacuolar..	31
Figura 9. Galectina-3 exerce um papel na produção de IL-1 β em infecções com <i>L. braziliensis</i>	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.2 IMUNIDADE INATA.....	4
1.2.1 Resposta imune inata mediada por células.....	4
1.3 RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES.....	5
1.3.1 Receptores do tipo <i>Toll</i>.....	6
1.3.2 Receptores do tipo NOD.....	7
1.3.3 Os inflamassomas.....	7
1.4 RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO: LEISHMANIOSE.....	9
1. OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 ANIMAIS.....	16
3.2 PARASITOS.....	16
3.3 DOSAGEM DE IL-1B.....	17
3.4 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	17
3.5 INFECCÃO DE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>.....	18
3.6 IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	18
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19

4. RESULTADOS	21
4.1 AS δ-AMASTINAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> MODULAM NEGATIVAMENTE A PRODUÇÃO DE IL-1B EM MACRÓFAGOS MURINOS.....	21
4.2 AS δ-AMASTINAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> REGULAM NEGATIVAMENTE A ATIVAÇÃO DE CASPASE-1.	24
4.3 A REGULAÇÃO NEGATIVA DA SECREÇÃO DE IL-1B POR δ- AMASTINAS INDEPENDENTE DOS INFLAMASSOMAS DE CASPASE-11 E NLRC4.....	26
4.4 AS AMASTINAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> ESTÃO ENVOLVIDAS COM INTEGRIDADE VACUOLAR.....	29
4.5 GALECTINA-3 APRESENTA PAPEL NA PRODUÇÃO DE IL-1B POR MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>.....	31
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

Apesar de a leishmaniose ser um grande problema de saúde pública global, ela é considerada uma doença negligenciada (HOTEZ et al., 2006). A leishmaniose é endêmica em várias regiões da América do Sul e Central, norte da África, partes da Ásia e Oriente Médio. Atualmente, é estimado que existam cerca de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose por ano, sendo 1,2 milhões de leishmaniose cutânea e 300 mil casos da forma visceral, a mais grave forma da doença, resultando em cerca de 20 a 30 mil mortes por ano (ALVAR et al., 2012). Em especial nas Américas, o Brasil é o país com maior número de casos de leishmaniose visceral e Peru e Bolívia são os países com maior número de pessoas vivendo com lesões desfigurantes causadas pela leishmaniose (KARIMKHANI et al., 2016). Os agentes etiológicos da leishmaniose são parasitos do gênero *Leishmania* e a progressão de seus sintomas varia conforme a espécie, a cepa do parasito e a predisposição do sistema imune do hospedeiro (NOVAIS et al., 2015), de forma que casos mais graves frequentemente acometem pacientes com sistema imune suprimido (DENIAU et al., 2002).

Em indivíduos infectados há uma variação de quadros clínicos, indo de hospedeiros assintomáticos (RIERA et al., 2004) ao grave quadro da leishmaniose visceral (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007). A leishmaniose tegumentar (LT) é um quadro com lesões ulcerosas na pele que cicatrizam em alguns meses. Já a leishmaniose tegumentar difusa (LTD) é um quadro agressivo de LT com lesões espalhadas de forma difusa e em grande quantidade. A leishmaniose mucocutânea (LM) é um quadro em que as lesões se estendem para regiões de mucosa do nariz e da boca com grande capacidade desfigurante em tais tecidos. A leishmaniose Visceral (LV), a forma mais grave da doença, ocorre quando órgãos internos são acometidos pelos

parasitos levando a quadros de esplenomegalia e hepatomegalia, febre e perda de peso, podendo levar o paciente a óbito quando não tratada. Por último, a leishmaniose pós-visceral dérmica (LPVD) é um quadro geralmente expresso em pacientes após a cura clínica da versão visceral da doença que se manifesta através de pápulas espalhadas de forma difusa na pele. Além do quadro infeccioso, as cicatrizes e os efeitos das lesões tegumentares e, principalmente, mucocutâneas possuem grande impacto negativo no bem estar social e psicológico de indivíduos afetados (YANIK et al., 2004).

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* que causam leishmaniose ocorre em duas fases principais. Uma fase acontece em hospedeiro díptero da subfamília Phlebotominae e a outra em hospedeiro mamífero. Dentre os flebotomídeos, 34 espécies possuem fortes evidências de transmissão e 19 são confirmadas como vetores de *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1990), sendo no Brasil *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* as duas espécies de vetores mais importantes. No sistema digestório dos vetores, os parasitos se encontram no estado de promastigotas, uma forma móvel e alongada com um flagelo proeminente. As promastigotas se diferenciam para uma forma infectiva (promastigotas metacíclicas) e são inoculadas através da probóscide do inseto para o tecido de um hospedeiro mamífero no momento do repasto sanguíneo. Os parasitos são então fagocitados por macrófagos e se diferenciam na forma amastigota, arredondada e com flagelo reduzido. Nos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, as formas amastigotas modulam e subvertem a sinalização intracelular, evadindo a atividade microbicida do macrófago (GREGORY; OLIVIER, 2005) e se reproduzem por fissão binária, até causar um rompimento da membrana celular, sendo liberados no meio extracelular e infectando outras células.

1.2 IMUNIDADE INATA

A imunidade inata é definida como a primeira linha de defesa contra patógenos, representando uma resposta sistêmica crucial para prevenir infecções e manter homeostase (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017), assim como ativar e regular a imunidade adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). A imunidade inata é composta majoritariamente por três níveis de ação (RIERA ROMO; PÉREZ-MARTÍNEZ; CASTILLO FERRER, 2016). O primeiro são as barreiras físicas e químicas, como a presença de secreções mucosas e estruturas especializadas na pele e na mucosa. O segundo é composto pela imunidade humoral, em que, através de peptídeos antimicrobianos, do sistema complemento, anticorpos naturais e outros mecanismos, microrganismos que ultrapassaram as barreiras físicas e químicas são controlados. O terceiro nível é composto pela resposta imune inata mediada por células que atua conjuntamente a imunidade humoral na contenção de organismos patogênicos através de uma população diversificada de células. De modo geral, os componentes da imunidade inata presentes em diversos níveis apresentam bom grau de preservação, em gnathostomata, vertebrados com mandíbulas, com algumas variações e características específicas (URIBE et al., 2011).

1.2.1 Resposta imune inata mediada por células

De modo geral, as células da imunidade inata são aptas a desenvolver uma resposta primária a infecções, criando uma condição inflamatória (NEWTON; DIXIT, 2012). A imunidade inata mediada por células é composta por populações celulares diversas, dentre elas os linfócitos T intraepiteliais, as células citotóxicas não específicas e as células mieloides fagocíticas (RIERA ROMO; PÉREZ-MARTÍNEZ; CASTILLO FERRER, 2016). As células T intraepiteliais são um tipo específico de

linfócito apto a reconhecer e destruir patógenos, sendo fenotipicamente descritas como linfócitos $\delta\gamma$ (HAYDAY et al., 2001). As células citotóxicas não específicas são um dos mecanismos celulares mais importantes na imunidade de vertebrados, exercendo papel na defesa antiviral e na vigilância imunológica (CALIGIURI, 2008), sendo os linfócitos *natural killers* seus principais representantes. As células mieloides fagocíticas, ou fagócitos profissionais, são os principais componentes da imunidade inata de vertebrados, esse tipo de leucócitos incluem os macrófagos, os neutrófilos, os basófilos e os eosinófilos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017). Elas fagocitam e destroem patógenos, remanescentes celulares e corpos apoptóticos; secretam citocinas, o que auxilia no desenvolvimento de uma resposta inflamatória; e liberam mediadores solúveis como histamina, espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), espécies reativas de nitrogênio, lisozimas e AMPs (ZENEWICZ; SHEN, 2007). As células mieloides fagocíticas reconhecem células senescentes e micróbios através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – *Pattern Recognizing Receptors*) e apresentam antígenos fagocitados à linfócitos B ou T, induzindo a ativação da resposta imune adaptativa (ZENEWICZ; SHEN, 2007).

1.3 RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES

Os principais PRRs expressos em vertebrados são os receptores tipo-Toll (TLR, *Toll-Like Receptors*), receptores de lectina do tipo C, helicases RIG-I e receptores do tipo NOD (NLR – *NOD-Like Receptors*). Em conjunto, os receptores são capazes de reconhecer estruturas químicas presentes em todos os microrganismos, como lipopolissacarídeos (LPS – *Lipopolysaccharides*), lipoproteínas, glicídios complexos, formilmetionina, nucleotídeos e ácidos nucléicos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). A exceção de alguns receptores do tipo NOD a detecção de PAMPs ou de padrões

moleculares associados a danos (DAMP – *Damage Associated Molecular Pattern*) pelos PRRs induz a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória. A resposta inflamatória é orquestrada por citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF – *Tumor Necrosis Factor*), a interleucina 1 (IL-1) e IL-6 (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Enquanto TNF e IL-6 são reguladas a nível transcricional, a produção de IL-1 β é regulada em duas etapas. A primeira etapa ocorre a nível transcricional, dependente de sinalização via TLR. Já a segunda depende da clivagem da pro-IL-1 β em sua forma ativa pela caspase-1, uma protease ativada através de um inflamassoma (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). Em respostas antivirais, os interferons do tipo I estão envolvidos na modulação da inflamação (HONDA; TAKAOKA; TANIGUCHI, 2006).

1.3.1 Receptores do tipo *Toll*

A família dos TLRs é uma das mais bem estudadas e é responsável por detectar patógenos no meio extracelular e em endossomos e lisossomos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Diferentes TLRs reconhecem diferentes padrões moleculares ligados a patógenos (PAMP – *Pathogen Associated Molecular Pattern*). Um exemplo é o TLR4 apto a reconhecer LPS na superfície celular conjuntamente com o fator de diferenciação mieloide 3 (PARK et al., 2009). O reconhecimento de PAMPs por TLRs regula positivamente a transcrição de diversos genes dependendo do tipo celular e do TLR envolvido. A sinalização via TLR é dividida em duas vias distintas dependendo das moléculas adaptadoras recrutadas em de acordo com o TLR ativado, MyD88 e TRIF (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Ambas as vias resultam na ativação de NF- κ B, que por sua vez modula positivamente a expressão de diversas citocinas. A via por TRIF, e a via por MyD88 em casos de ativação de TLR7 e TLR9 por ácidos nucleicos, induzem a

expressão de interferons do tipo I, resultando em uma resposta inflamatória apta combater vírus (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

1.3.2 Receptores do tipo NOD

A família dos NLRs consiste de sensores citoplasmático de patógenos compostos de um domínio central com afinidade por nucleotídeos e um domínio C-terminal rico em repetições de leucina (INOHARA et al., 2005). A porção N-terminal da maioria dos NLRs possui motivos que se ligam às proteínas, como os domínios CARD, pirina e BIR. NOD1 e NOD3, que possuem domínios CARD C-terminais, são NLRs que reconhecem PAMPs e agem sinergisticamente com TLRs na ativação da produção de citocinas pró inflamatórias (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Alguns NLRs não estão envolvidos na ativação transcricional de mediadores inflamatórios, mas são componentes centrais de inflamassomas canônicos que atuam na ativação de caspase-1.

1.3.3 Os inflamassomas

Alguns NLRs, assim como o receptor AIM2 (*Absent in Melanoma – 2*) e a proteína pirina podem compor uma plataforma de sinalização celular conhecida como inflamassoma. Tais complexos são tipicamente compostos por um sensor que define o inflamassoma, uma molécula adaptadora – ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) – e caspase-1 (MALIK; KANNEGANTI, 2017). Após a detecção de um estímulo pela proteína sensora, ocorre o recrutamento de moléculas de ASC para formar um complexo multimérico, observado como um ponto (*speck* ou *puncta*) no citoplasma. ASCs oligomerizados recrutam procaspase-1, que, através de auto clivagem induzida por proximidade, é convertida na forma ativa, caspase-1. Logo, as subunidades ativas de caspase-1, p20 e p10, clivam pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas

formas ativas e ativa a proteína formadora de poros, gasdermina D (HE et al., 2015), que por sua vez induzirá uma forma de morte celular inflamatória conhecida como piroptose. A ativação do inflamassoma possui funções críticas na defesa contra patógenos; ela ajuda a remover células danificadas e transformadas e estimula a reposta imune adaptativa.

Diferentes sensores são ativados por diferentes PAMPS ou DAMPs. O inflamassoma de AIM2 é um importante sensor de DNA citosólico em dupla-fita (BÜRCKSTÜMMER et al., 2009), tal inflamassoma é ativado em infecções virais ou bacterianas, como, por exemplo, a infecção pelo citomegalovírus de camundongo (RATHINAM et al., 2010). Os inflamassomas de Nlr4 e Nlrp1 são ativados mediante o reconhecimento proteínas bacterianas patogênicas, como a flagelina (MIAO et al., 2006) e o fator letal da toxina produzida por *Bacillus anthracis* (BOYDEN; DIETRICH, 2006), respectivamente. Já o inflamassoma de pirina é ativado através de modificações de proteínas do citoesqueleto, como modificações dos membros da família Rho por toxinas de diferentes bactérias (XU et al., 2014). O inflamassoma de Nlrp3 é ativado por uma vasta gama de DAMPs endógenos e infecciosos como componentes da parede celular microbiana, ácidos nucleicos, toxinas formadoras de poros, cristais e moléculas endógenas como ATP e cristais de ácido úrico (MALIK; KANNEGANTI, 2017).

Dos inflamassomas conhecidos, o de Nlrp3 é o mais bem estudado, estando envolvido diversas patologias, como a febre familiar mediterrânea (CHURCH; COOK; MCDERMOTT, 2008), gota (MARTINON, 2007), na neuroinflamação presente em pacientes com o mal de Alzheimer, Parkinson e doenças priônicas (SHI; KOUADIR; YANG, 2015). Além disso, Nlrp3 apresenta papel em diversas infecções, seja por vírus (SARVESTANI; MCAULEY, 2017), bactérias (SEGOVIA et al., 2018), fungos (GONÇALVES et al., 2017) ou protozoários (LIMA-JUNIOR et al., 2013). A ativação

de Nlrp3 acontece em duas etapas. Primeiro, requer um estímulo inflamatório primário por TLR, que resulta na indução transcricional de Nlrp3 (JULIANA et al., 2012) e induz a ubiquitinação de Nlrp3 pela proteína BRCC3 (PY et al., 2013) o que permite a ativação do receptor. Já a segunda etapa é a ativação direta do receptor pelos diferentes sinais de estresse, conduzindo a formação do inflamassoma. Como Nlrp3 é ativado em resposta a uma alta diversidade de DAMPs, é provável que seja ativado por um estresse celular induzido por tais moléculas, ao invés de interagir diretamente com elas. Mudanças no volume celular, ruptura de lisossomos, efluxo de K^+ e sinalização por Ca^{2+} são sinais reconhecidos por Nlrp3 (MALIK; KANNEGANTI, 2017). No entanto, são pouco conhecidos os processos pelos quais Nlrp3 é ativado por tais sinais. Nesse sentido, recentemente, elucidou-se o papel de caspase-11 em uma ativação não canônica de Nlrp3 (KAYAGAKI et al., 2011), apresentando, pelo menos nesse caso, um intermediário entre Nlrp3 e os estímulos que induzem sua ativação, ilustrando um processo no qual NLRP3 é ativado mediante um estímulo.

1.4 RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO: LEISHMANIOSE

Recentemente foi descrito o papel do inflamassoma de Nlrp3 na resistência do hospedeiro à parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a ativação da plataforma de Nlrp3 é essencial na restrição da replicação do parasito em modelo experimental. A liberação de IL-1 β contribui, através de sinalização entre IL-1R e MyD88, na indução da produção de óxido nítrico (NO) pela enzima NOS2, que é o principal mecanismo de defesa contra *Leishmania spp.* (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

Os parasitos do gênero *Leishmania spp.* possuem estratégias de evasão que permitem suprimir as atividades microbicidas dos macrófagos alterando vias de

sinalização e estabelecendo a infecção (GREGORY; OLIVIER, 2005). Para tal função, uma gama de moléculas agem como fatores de virulência, agindo tanto na superfície de contato entre as membranas do parasito e do vacúolo (DE PAIVA et al., 2015) quanto além da membrana vacuolar, afetando o citoplasma e o envelope nuclear (ISNARD et al., 2015). Entre os fatores de virulência conhecidos estão (OLIVIER et al., 2012): lipofosfoglicanos (LPG), glicoinositolfosfolipídios, proteofosfoglicanos, proteases de cisteína, fosfatases ácidas secretadas e, o exemplo mais bem descrito na literatura, a metaloprotease GP63 (OLIVIER et al., 2012). A GP63 age na ativação de fosfatases do hospedeiro (PTPs – *Protein Tyrosine Phosphatases*) (GOMEZ et al., 2009) e na modificação de fatores de transcrição através de clivagem proteolítica (GREGORY et al., 2008). Para desenvolver a subversão do sistema das vias de sinalização, a proteína GP63 atua no citosol e no envelope nuclear do macrófago (CONTRERAS et al., 2010) alterando também a fisiologia nuclear e a complexidade do poro nuclear (ISNARD et al., 2015). GP63 atua no citosol atenuando a expressão de IL-1 β e a formação de espécies reativas de oxigênio, inibindo significativamente a ativação do inflamassoma de Nlrp3 induzida por cristais (SHIO et al., 2015). A exportação de fatores de virulência e de outras moléculas ocorre predominantemente através da formação de exossomos (SILVERMAN et al., 2010). Dessa forma a comunicação entre parasitos e o macrófago é intermediada por tais vesículas. Entretanto, é desconhecido o mecanismo pelo qual as proteínas exportadas pelos parasitos atravessam a membrana vacuolar e se dispersam no citosol da célula hospedeira, configurando-se essa uma questão de grande importância a ser elucidada na relação patógeno-hospedeiro na leishmaniose.

Uma família de proteínas pode estar relacionada com a exportação de proteínas de *Leishmania spp.* para o macrófago. Recentemente, elucidou-se o papel das amastinas, uma família de glicoproteínas de superfície que atuam diretamente no

contato entre membranas de amastigotas de *Leishmania spp.* e a membrana do vacúolo parasitóforo do macrófago hospedeiro. A princípio, as amastinas foram identificadas em amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA et al., 1994), *Leishmania major* e *Leishmania infantum* (WU et al., 2000). Todos os membros da família possuem um domínio conservado com cerca de 11 resíduos de aminoácidos e uma sequência total de 180 a 200 resíduos de aminoácidos (ROCHETTE et al., 2005) e são expressas entre espécies de tripanossomatídeos sem, contudo, apresentar proteínas homólogas fora desse grupo (JACKSON, 2010). As amastinas são divididas em quatro subfamílias, α , β , γ e δ e há uma grande expansão da subfamília das δ -amastinas em espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, sendo que há um total de 52 genes que expressam amastinas em *Leishmania braziliensis* e 11 em *Leishmania tarentolae* (RAYMOND et al., 2012), parasito que infecta lagartos. Análises estruturais *in silico* demonstraram semelhança estrutural entre amastinas e claudinas, proteínas participantes das junções de oclusão entre membranas celulares em mamíferos (GÜNZEL; YU, 2013). Para melhor compreender o papel desempenhado pelas amastinas na relação patógeno-hospedeiro foram desenvolvidas linhagens de *Leishmania braziliensis* com a expressão das δ -amastinas silenciadas através da técnica de RNA de interferência (RNAi). Parasitos com δ -amastinas-RNAi proliferam menos em infecção *in vitro* em macrófagos murinos e foram incapazes de estabelecer uma infecção quando inoculadas em camundongo BALB/c, ambos fenótipos revertidos pela expressão de δ -amastinas resistente a RNAi (DE PAIVA et al., 2015). Análises por microscopia eletrônica de transmissão demonstraram alterações significativas no contato normalmente observado entre as membranas de amastigotas e do vacúolo parasitóforo, de forma que a membrana do vacúolo se torna desorganizada em regiões onde não há contato com o parasito (DE PAIVA et al., 2015). Como as amastinas são proteínas atuantes no contato

entre as membranas do parasito e do vacúolo do hospedeiro, possivelmente elas atuam direta ou indiretamente em conjunto com os exossomos na exportação de fatores de virulência para o citosol da célula hospedeira.

Diante do exposto, este trabalho pretende analisar o efeito de linhagens de *Leishmania braziliensis* com suas δ -amastinas silenciadas em receptores aptos a formar inflamassomas no citoplasma de macrófagos, em especial o inflamassoma de Nlrp3 cuja atuação na contenção de parasitos de *Leishmania spp.* foi descrita recentemente (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Além disso, observar se durante a infecção por *Leishmania braziliensis* com δ -amastinas-RNAi há irregularidades na manutenção da estabilidade vacuolar.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

-Avaliar o papel das amastinas na ativação do inflamassoma de Nlrp3 e na estabilidade vacuolar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ativação do inflamassoma de Nlrp3 frente a infecção com parasitos com expressão silenciada de amastinas.

-Investigar o papel de outros inflamassomas, o de Caspase-11 e o de Nlrc4, na produção geral de IL-1 β de maneira dependente de amastina.

-Investigar o papel das amastinas na manutenção da estabilidade vacuolar.

-Investigar se Galectina-3 exerce papel na ativação geral do inflamassoma de Nlrp3.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6, provenientes do Biotério Central da FMRP-USP. Camundongos *Nlrp3*^{-/-} foram obtidos do Centro de Criação de Camundongos Especiais (USP-RP). Os animais utilizados em todos os experimentos tinham entre 7 e 9 semanas de idade. Os camundongos permaneceram no biotério do Departamento de Imunologia e Bioquímica e do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP - USP. Os animais foram mantidos em microisoladores, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C), ciclo claro-escuro de 12 horas cada e receberam água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP.

3.2 PARASITOS

Linhagens celulares de promastigotas de *Leishmania braziliensis* com silenciamento das δ -amastinas e linhagens com a expressão recuperadas δ -amastinas cedidas pelo grupo da professora Santuza Maria Ribeiro Teixeira (DE PAIVA et al., 2015) foram mantidas a 25°C em meio Schneider (Sigma-Co, Saint Louis, EUA) suplementado com soro bovino fetal a 20% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 2% de urina humana masculina e 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Co, Saint Louis, EUA) - Schneider completo (SC). Os parasitos foram rotineiramente cultivados em garrafas de cultura estéreis (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA). Para as infecções, 1×10^5 /ml formas promastigotas foram inoculadas em de meio Schneider e, após 5 dias, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato

(PBS - Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) estéril, contadas e utilizadas para infecção.

3.3 DOSAGEM DE IL-1 β

As concentrações de IL-1 β (Duoset; R&D Systems, Minneapolis, MN) em sobrenadantes de cultura foram determinadas por ELISA seguindo as instruções do fabricante.

3.4 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

Macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea (BMDMs) foram utilizados como modelo para experimentos *in vitro*. As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos e cultivadas em meio RPMI condicionado, sendo suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/ml de penicilina G potássica (USB) e com 30% de sobrenadante de cultura de células L929 (meio R20/30) conforme descrito previamente (WARREN; VOGEL, 1985), com algumas modificações. Resumidamente, camundongos foram eutanasiados e seus fêmures e tíbias cuidadosamente removidos, seccionados em ambiente estéril e lavados com PBS utilizando uma seringa com agulha 13 x 4,5 mm. As células recém-colhidas foram diluídas em meio R20/30 e distribuídas em placas de cultura em volume de 10 ml por placa utilizada (um fêmur gera 3 placas). Um total de 10 ml de meio R20/30 será adicionado após quatro dias de cultura. Entre o sétimo e o oitavo dia de cultura as células serão fenotipadas por citometria de fluxo - FACSCantoII (BD). Os experimentos

serão conduzidos com culturas de células possuindo no mínimo 80% de positividade para CD11b e F4/80.

3.5 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

As culturas de macrófagos serão ajustadas para uma concentração de $1,0 \times 10^6$ /ml em meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 50 μ M de 2-mercaptoetanol e 100 unidades/ml de penicilina G Potassium (USB Corporation Cleveland, OH USA). As células foram distribuídas em placas de 12 poços, sendo 1 ml por poço e mantidas em repouso durante 90-120 min para a aderência. Em alguns poços não foram adicionados parasitos, sendo esses utilizados como controle. As culturas infectadas foram mantidas a 33°C em estufa de CO₂ (5%), as análises devidas foram, então, realizadas.

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

BMDMs foram dispostos em lamínulas de 13mm na confluência de 2×10^5 células/poço, em placas de 24 poços. As células foram infectadas com as linhagens de *L. braziliensis* (MOI 10). As placas foram centrifugadas a 200 x g por 5 minutos em temperatura ambiente e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. As células foram então fixadas com paraformoladeido 4% e permeabilizadas com saponina 0.1%. As lamínulas foram lavadas com PBS e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com PBS contendo 10% soro de cabra. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram marcadas com anticorpo anti-Galectina-3 (Sigma 1:200) e anti-*Leishmania braziliensis* (Soro de coelho 1:2000), seguido da marcação com anticorpos secundários conjugados com fluoróforo específicos (diluição 1:300, Invitrogen, Molecular Probes).

Todas as lavagens dos anticorpos foram feitas em PBS e as todas as diluições foram em PBS-Soro de Cabra. As lamínulas foram invertidas em meio de montagem contendo DAPI (DAPI Prolong® Gold antifade reagent, Invitrogen) em lâminas para microscopia de fluorescência. A avaliação formação de agregados de galectina-3 foi realizada pela observação do número de 100 células infectadas em aumento de 100x, no microscópio Leica DMI 4000B. A porcentagem de células apresentando agregados de galectina-3 foram obtidas e os desvios padrão foram calculados a partir de três lamínulas.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão representados como média mais erro padrão da média (SEM). Para comparação entre múltiplos grupos, será utilizada a análise de variância (*two-way* ANOVA ou *one-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Diferenças nos valores entre dois grupos serão determinadas utilizando o teste *t* de Student. Todas as análises serão feitas com o auxílio do software GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Serão consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de *P* igual ou menor a 0,05.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 AS δ -AMASTINAS DE *L. BRAZILIENSIS* MODULAM NEGATIVAMENTE A PRODUÇÃO DE IL-1 β EM MACRÓFAGOS MURINOS

O papel das δ -amastinas de *L. braziliensis* sobre a ativação do inflamassoma é até então desconhecido. Em trabalhos anteriores (LIMA-JUNIOR et al., 2013), descobriu-se que a produção de IL-1 β em macrófagos infectados por *Leishmania* spp. é dependente do inflamassoma de Nlrp3. Logo, para avaliar o papel das δ -amastinas na ativação do inflamassoma, macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com parasitos de uma linhagem de *L. braziliensis* com expressão silenciada, pela técnica do RNA de interferência (RNAi), do gene LbrM.20.1060 referente a uma δ -amastina, cedida pelo grupo da professora Santuza M. R. Teixeira (DE PAIVA et al., 2015). Como demonstrado anteriormente (DE PAIVA et al., 2015), a expressão de dsRNAs referentes ao gene LbrM.20.1060 afeta o nível de expressão de 60% dos membros da subfamília das δ -amastinas. Visando induzir a expressão dos componentes do inflamassoma no experimento, as células foram estimuladas com 500 ng/ml de LPS quatro horas antes da infecção. Após 24 horas da infecção, sobrenadantes das culturas foram coletados e as concentrações de IL-1 β foram aferidas por ensaio de ELISA.

Como controle positivo foi utilizado nigericina, um potente ativador do inflamassoma de Nlrp3 (MARIATHASAN et al., 2006). Os níveis da liberação de IL-1 β em macrófagos estimulados com nigericina são muito superiores aos níveis de liberação IL-1 β de macrófagos infectados com *L. braziliensis* (Figura 1). Tal padrão é visto em trabalhos anteriores (LIMA-JUNIOR et al., 2013), o que sugere um padrão de ativação moderado pelos parasitos.

Conforme demonstrado anteriormente (LIMA-JUNIOR et al., 2013), a produção de IL-1 β na infecção pelos parasitos foi dependente de Nlrp3, uma vez que macrófagos *Nlrp3*^{-/-} produziram níveis de IL-1 β estatisticamente semelhantes aos níveis dos não infectados, porém estimulados com LPS. Não foi observada nenhuma alteração quanto a produção de IL-1 β em macrófagos *Nlrp3*^{-/-} infectados por parasitos com δ -amastinas silenciadas (Figura 1). Logo, é plausível concluir que mesmo com baixos níveis de expressão de δ -amastinas a liberação de IL-1 β é dependente de Nlrp3.

Quando comparados aos macrófagos infectados pela linhagem selvagem, os infectados por parasitos com δ -amastinas silenciadas liberaram uma quantidade superior de IL-1 β dependente de Nlrp3 (Figura 1). Desta forma, conclui-se que as δ -amastinas estão possivelmente relacionadas à mecanismos de contenção da ativação do inflamassoma.

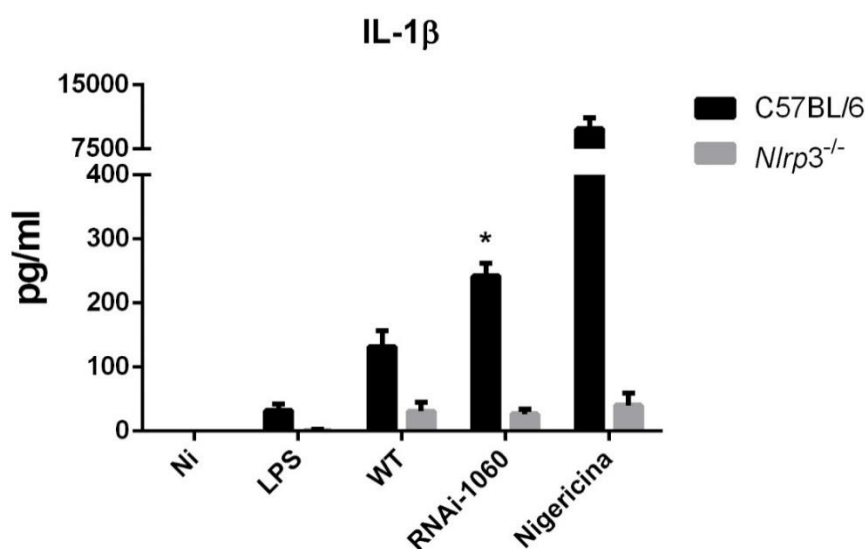


Figura 1. Parasitos δ -amastinas-RNAi induzem maior secreção de IL-1 β comparados aos selvagens. Quantificação de IL-1 β por ensaio de ELISA a partir de sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens (C57BL/6) ou deficientes para Nlrp3 (*Nlrp3*^{-/-}) infectados com promastigotos em fase estacionária de *L. braziliensis*. Ni – células não infectadas e não estimuladas com LPS; LPS – células não infectadas estimuladas com LPS; WT – linhagem selvagem MHOM/BR/75/M2904; RNAi-1060 – linhagens geradas a partir de clone contendo construção para silenciamento por RNAi da expressão de LbrM.20.1060; e Nigericina – células estimuladas com nigericina, um potente ativador de Nlrp3 (MARIATHASAN et al., 2006). Os macrófagos utilizados no experimento foram estimulados quatro horas previamente à infecção com LPS. Dados representados como média \pm desvio padrão da média (DPM); *p<0,05 no teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni.

A fim de averiguar se algum possível artefato do silenciamento das δ -amastinas estava gerando as diferenças de liberação de IL-1 β observadas, foi utilizada uma linhagem de parasitos transgênicos, também cedidos pelo grupo da professora Santuza M. R. Teixeira (DE PAIVA et al., 2015) cuja expressão da amastina LbrM.20.1060 foi reconstituída. Na construção foi utilizado um DNA sintético com modificações de terceira base, conferindo divergências ao dsRNA usado na técnica de silenciamento. Dessa forma a sequência nucleotídica é alterada preservando a sequência de aminoácidos na proteína final.

Apesar de induzir, nos macrófagos infectados, uma liberação de IL-1 β superior quando comparadas a linhagem selvagem, a linhagem reconstituída induz uma liberação de IL-1 β significativamente inferior àquela induzida pela linhagem com expressão de δ -amastinas silenciada (Figura 2). Portanto, é possível inferir que a elevada liberação de IL-1 β pelos macrófagos infectados por parasitos com menos δ -amastinas não se deve a algum artefato indesejado da técnica de silenciamento por RNA de interferência.

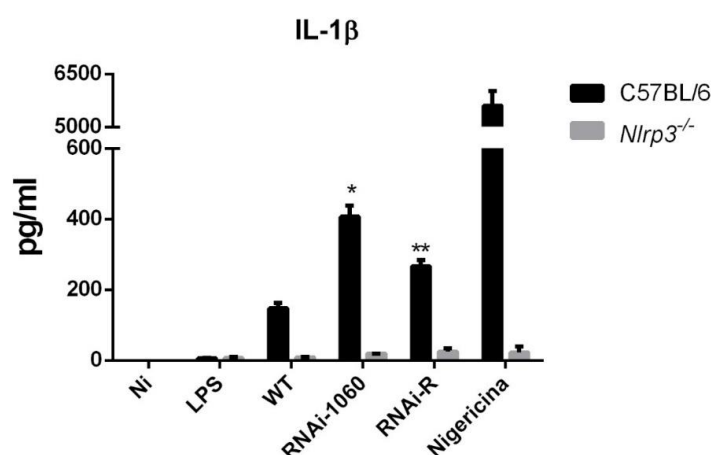


Figura 2. Parasitos δ -amastinas-RNAi induzem maior ativação de IL-1 β comparados ao clone com expressão reconstituída de amastina. Quantificação de IL-1 β por ensaio de ELISA a partir de sobrenadantes de macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 selvagens (C57BL/6) ou deficientes para Nlrp3 (*Nlrp3*^{-/-}) infectados com promastigotos em fase estacionária de *L. braziliensis* das linhagens WT; RNAi-1060; RNAi R1 – linhagens com expressão reconstituída da expressão das δ -amastinas e Nigericina. Macrófagos estimulados previamente com LPS. Dados representados como média \pm DPM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$.

4.2 AS δ -AMASTINAS DE *L. BRAZILIENSIS* REGULAM NEGATIVAMENTE A ATIVAÇÃO DE CASPASE-1

Inflamassomas ativos recrutam e clivam a pro-caspase-1 em sua forma ativa, que sequencialmente induz a liberação de IL-1 β e outros fenômenos pró inflamatórios nas células e suas adjacências (SUN; SCOTT, 2016). Segundo trabalhos anteriores (LIMA-JUNIOR et al., 2013), a liberação de IL-1 β para o meio extracelular durante a infecção por *Leishmania* sp. é dependente da ativação de caspase-1, assim como respostas inflamatórias aptas a promover o controle da infecção. Logo, para avaliar a ativação de caspase-1 induzida por parasitos contendo uma redução na expressão das δ -amastinas, infectou-se macrófagos derivados de camundongos C57BL/6 e, após 48 horas de infecção, incubou-se as células infectadas com a sonda FAM-YVAD-FMK (FLICA). Tal sonda é permeável à membrana plasmática por conter o grupamento FMK. O sítio ativo de caspase-1 interage com o peptídeo YVAD, sendo a fluorescência detectada pelo fluoróforo FAM através de citometria de fluxo (AMSTAD et al., 2001).

Os macrófagos infectados por parasitos contendo expressão reduzida de δ -amastinas apresentaram uma quantidade maior de células fluorescentes (Figura 3) quando comparados às células não infectadas, resultando em uma alta média integrada de fluorescência (iMIF). Já os macrófagos infectados pela linhagem selvagem de *L. braziliensis* e pela linhagem com expressão da amastina LbrM.20.1060 reconstituída apresentaram uma quantidade de células fluorescentes levemente maior que as células não infectadas. Ao comparar a fluorescência dos macrófagos infectados com os parasitos com expressão reduzida de δ -amastina com as os macrófagos infectados com as outras duas linhagens, a diferença na quantidade de células fluorescentes e na média integrada de fluorescência é significativamente alta (Figura 3). Tais resultados permitem

concluir que a quantidade de caspase-1 ativa é maior em macrófagos infectados por parasitos com expressão reduzida de δ -amastinas.

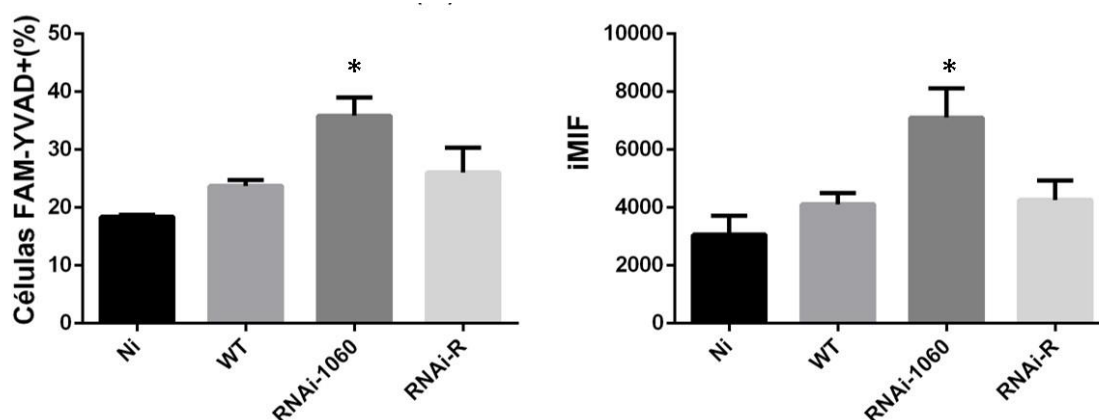


Figura 3. Parasitos δ -amastinas-RNAi induzem maior ativação de caspase-1. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram infectados com as linhagens WT, RNAi-1060 e RNAi-R por 48 horas. Posteriormente as células foram coletadas e submetidas ao protocolo de marcação com a sonda FAM-YVAD-FMK para detecção de caspase-1 ativa conforme instruções do fabricante. Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. iMIF – Média Integrada de Fluorescência. Dados representados como média \pm DPM; * $p < 0,05$.

Visando avaliar se a ativação de caspase-1 em função da redução na expressão das amastinas era em função da ativação do inflamassoma de Nlrp3, o mesmo experimento foi realizado em células de camundongos *Nlrp3*^{-/-} (Figura 4). Não foi observada nenhuma alteração significativa nos níveis de fluorescência entre os macrófagos infectados pelas diferentes linhagens de *L. braziliensis* utilizada. Dessa forma, é possível concluir que tanto a maior ativação de caspase-1 em macrófagos infectados por parasitos deficientes para δ -amastinas, quanto a ativação geral de caspase-1 em função das infecções com as linhagens utilizadas se deve a ativação do inflamassoma de Nlrp3.

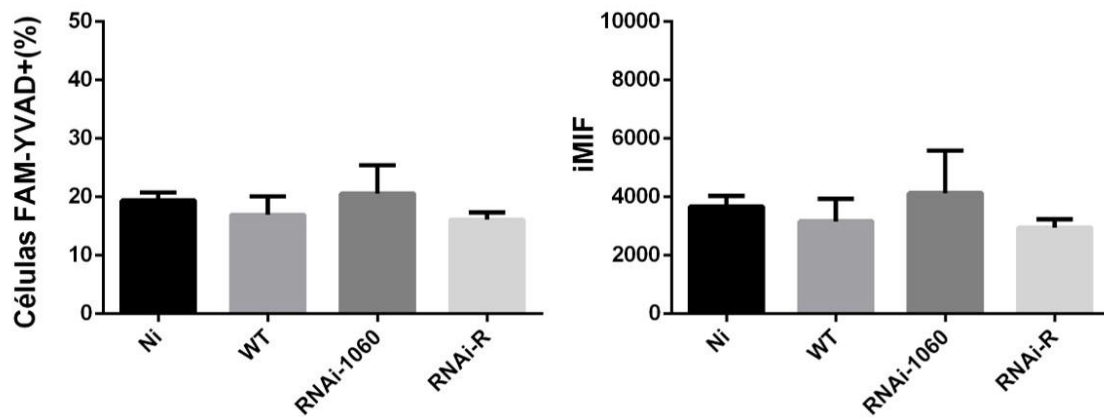


Figura 4. Parasitos δ -amastinas-RNAi não ativam caspase-1 em animais $Nlrp3^{-/-}$. Macrófagos $Nlrp3^{-/-}$ foram infectados com as linhagens WT, RNAi-1060 e RNAi-R por 48 horas. Posteriormente, as células foram marcadas com a sonda FAM-YVAD-FMK. Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. Dados representados como média \pm DPM.

4.3 A REGULAÇÃO NEGATIVA DA SECREÇÃO DE IL-1 β POR δ -AMASTINAS INDEPENDENTE DOS INFLAMASSOMAS DE CASPASE-11 E NLRC4

Recentemente, foi descoberta a atuação de *Leishmania* spp. na ativação de outro inflamassoma além de Nlrp3, o de Caspase-11 (DE CARVALHO et al., 2019). Visando estudar o papel do inflamassoma de Caspase-11 em infecções de parasitos com expressão deficiente de δ -amastinas, macrófagos derivados de medula óssea $Casp11^{-/-}$ foram infectados com promastigotas metacíclicas das três linhagens de *L. braziliensis* (selvagem, expressão de δ -amastinas silenciada, e reconstituída). Os níveis de IL-1 β presentes no sobrenadante foram coletados e medidos após 24 horas de infecção (Figura 5).

Assim como demonstrado anteriormente (DE CARVALHO et al., 2019), o inflamassoma de Caspase-11 exerce atividade geral na intensificação da resposta em níveis de IL-1 β frente a infecção por *L. braziliensis*. Tal fenótipo foi demonstrado em infecções com as três linhagens utilizadas, em que houve uma redução da secreção total de IL-1 β em todos os casos (Figura 5). No entanto, não houve uma diferença na

variação fenotípica observada entre as três linhagens, uma vez que a linhagem com expressão irregular de δ -amastinas manteve um fenótipo de liberação superior às demais. Dessa forma, conclui-se que a ausência ou presença das δ -amastinas induzem diferenças no padrão de liberação de IL-1 β independentes de Caspase-11.

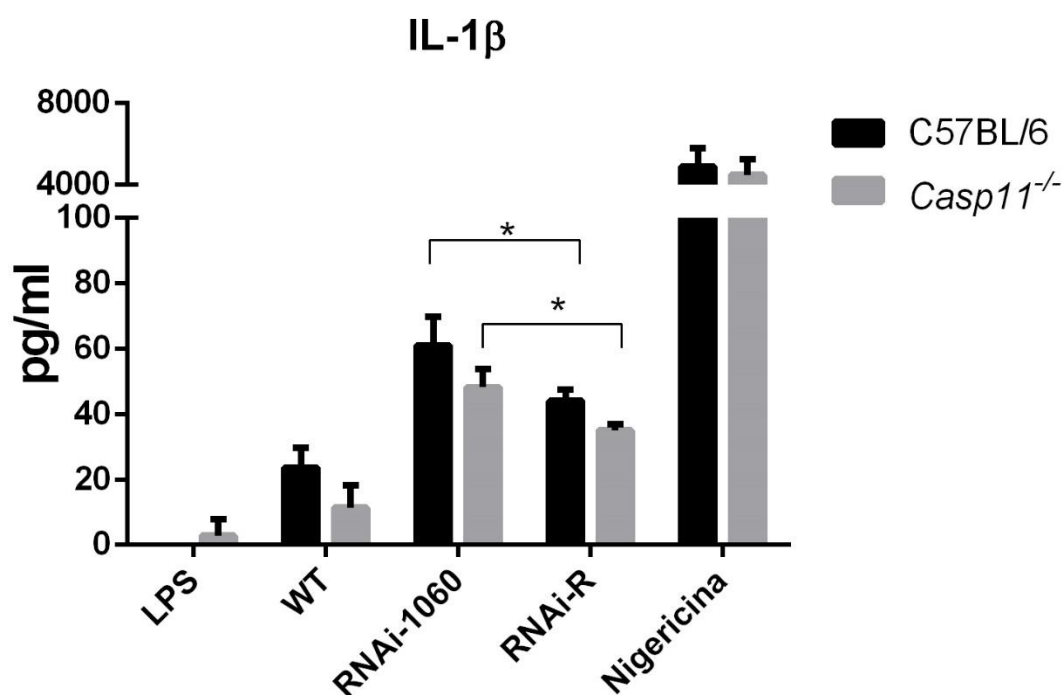


Figura 5. CASPASE-11 atua na liberação total de IL-1 β , mas não nas diferenças entre as infecções pelas linhagens com diferentes padrões de expressão das δ -amastinas. Quantificação de IL-1 β por ensaio de ELISA a partir de sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens (C57BL/6) ou deficientes para CASPASE-11 (Caspase-11) infectados com promastigotos em fase estacionária de *L. braziliensis* das linhagens WT, RNAi-1060 e RNAi-R. LPS – células não infectadas estimuladas com LPS; e Nigericina – células estimuladas com nigericina. Os macrófagos utilizados no experimento foram estimulados quatro horas previamente à infecção com LPS. Dados representados como média \pm desvio padrão da média (DPM); * P <0,05.

Para investigar se o inflamassoma de Nlr4 possui papel sobre as diferenças na liberação de IL-1 β observadas em infecções com parasitos deficientes para a expressão de amastinas, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos *Nlr4*^{-/-} foram infectados com promastigotas metacíclicas das três linhagens de *L. braziliensis* (Figura 6).

Seguindo um padrão semelhante ao demonstrado, anteriormente, por Caspase-11, o inflamassoma de Nlrc4 exerceu papel na intensificação da liberação de IL-1 β nas infecções pelas três linhagens de *L. braziliensis* utilizadas. Porém, não houve variação entre as proporções de liberação de IL-1 β entre as linhagens com expressão regular e irregular de amastinas. Dessa forma, é possível concluir que as diferenças observadas na liberação de IL-1 β em infecções de parasitos deficientes para amastinas não se deve aos inflamassomas de Caspase-11 e Nlrc4.

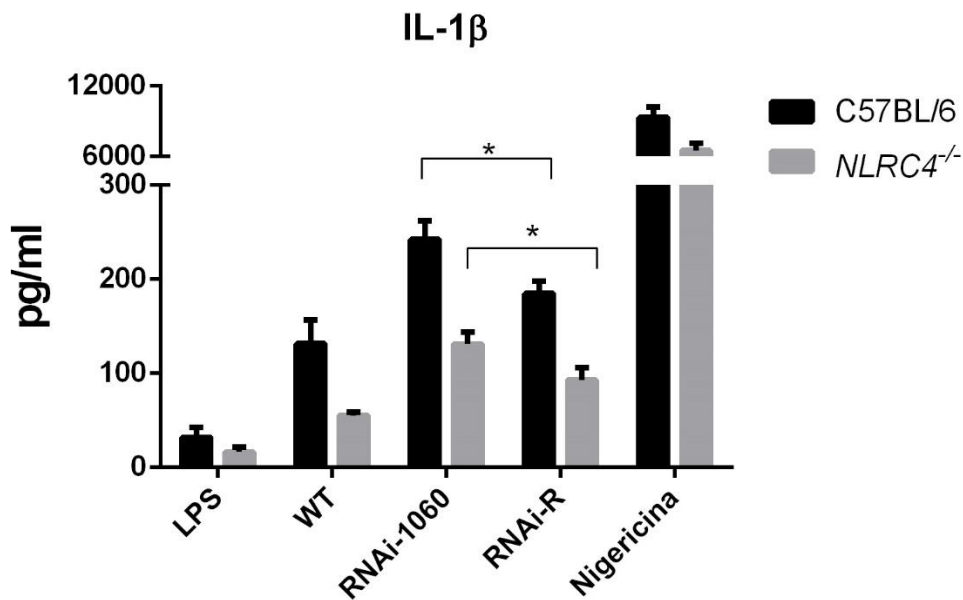


Figura 6. NLRC4 atua na liberação total de IL-1 β , mas não nas diferenças induzidas pelas linhagens com diferentes perfis de expressão de δ -amastinas. Quantificação de IL-1 β por ensaio de ELISA a partir de sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens (C57BL/6) ou deficientes para NLRC4 (Nlrc4^{-/-}) infectados com promastigotos em fase estacionária de *L. braziliensis* das linhagens WT, RNAi-1060 e RNAi-R. LPS – células não infectadas estimuladas com LPS; e Nigericina – células estimuladas com nigericina. Os macrófagos utilizados no experimento foram estimulados quatro horas previamente à infecção com LPS. Dados representados como média \pm DPM; * $P < 0,05$.

4.4 AS AMASTINAS DE *L. BRAZILIENSIS* ESTÃO ENVOLVIDAS COM INTEGRIDADE VACUOLAR

Em trabalhos anteriores, foram observadas pequenas desestabilizações na membrana vacuolar em vacúolos parasitóforos infectados com linhagens de *L. braziliensis* com expressão silenciada de amastinas (DE PAIVA et al., 2015). Logo, para investigar se as possíveis fissuras seriam um indício de indução de lise vacuolar, foi realizada uma imunofluorescência visando identificar agregados de Galectina-3, potenciais marcadores de lise vacuolar induzida por patógenos (PAZ et al., 2010). Em tais experimentos, macrófagos C57BL/6 foram infectados com linhagens de *L. braziliensis* com expressão de amastinas silenciadas e reconstituídas. Após 12 horas de infecção, as células foram fixadas e marcadas com DAPI e com anticorpos específicos para *Leishmania* spp. e Galectina-3.

Os agregados de Galectina-3, quando presentes, estavam adjacentes à vacúolos parasitóforos, onde estavam presentes os parasitos infectantes (Figura 7). Tanto em parasitos com expressão deficiente de amastinas, quanto em parasito com expressão reconstituída, foi observada a presença de agregados de Galectina-3. Dessa forma, os dados sugerem que mesmo em condições normais de expressão de amastina existem eventos de lise de vacúolo.

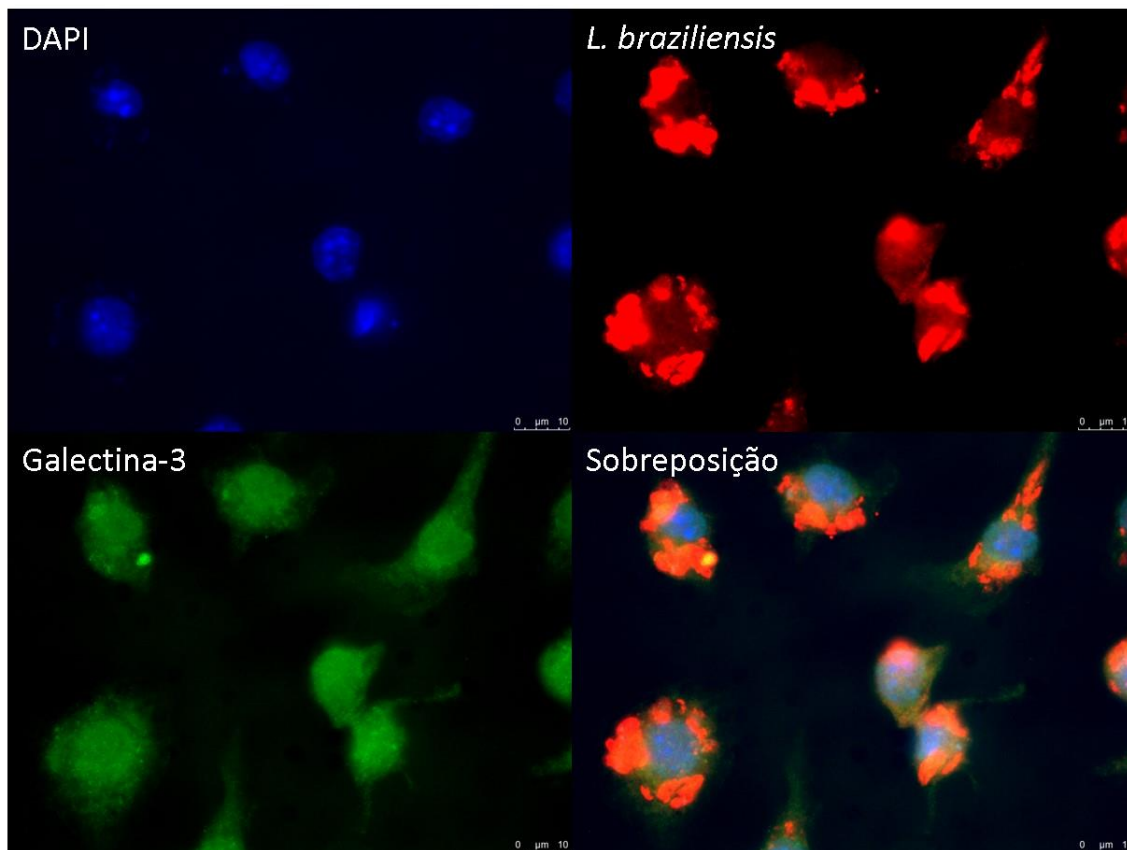


Figura 7. *L. braziliensis* induz a formação de agregados de Galectina-3. Microscopia de fluorescência realizada a partir de macrófagos (C57BL/6) fixados e marcados com DAPI e anticorpos específicos para *Leishmania* spp. e Galectina-3. Tais macrófagos foram infectados pelas linhagens de expressão silenciada de amastinas (RNAi-1060) e expressão reconstituída de amastinas (RNAi-R) 12 horas antes a fixação.

No entanto, a quantidade de agregados de Galectina-3 é consideravelmente maior nos macrófagos infectados por parasitos com expressão deficiente de δ -amastinas em comparação à macrófagos infectados por parasitos com expressão reconstituída (Figura 8). Desta forma, é possível concluir que a ausência de amastinas induz a uma maior probabilidade de lise vacuolar, correlacionando, portanto, as amastinas à integridade vacuolar.

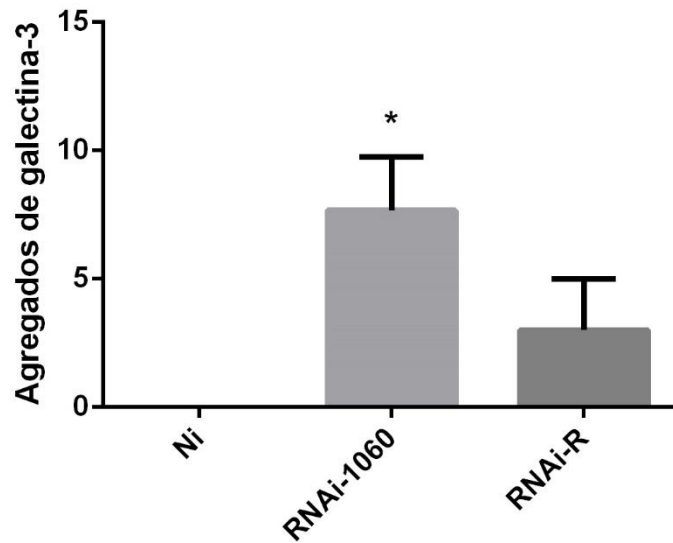


Figura 8. As amastinas de *L. braziliensis* estão correlacionadas com a integridade vacuolar. Quantificação dos agregados de Galectina-3 a cada 100 macrófagos infectados nos experimentos de imunofluorescência de Galectina-3 (Figura 7). Dados representados como média ± DPM; * $p < 0,05$. Ni – não infectado.

4.5 GALECTINA-3 APRESENTA PAPEL NA PRODUÇÃO DE IL-1B POR MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS*

Recentemente, elucidou-se o papel de Galectina-3 na promoção da ativação do inflamassoma de Nlrp3 e na produção de IL-1 β por macrófagos durante a fase aguda de uma colite (SIMOVIC MARKOVIC et al., 2016). Também foi estudado o mesmo papel de Galectina-3 durante uma infecção de macrófagos pelo vírus H5N1 Influenza A (CHEN et al., 2018). Desta forma, com o intuito de investigar se Galectina-3 possui papel durante a infecção por *L. braziliensis*, macrófagos selvagens e *Lgals3*^{-/-} foram infectados com parasitos selvagens, deficientes para amastinas e com expressão reconstituída de amastinas. A quantidade de IL-1 β presente nos sobrenadantes foi então medida por ELISA.

Todos os macrófagos *Lgals3*^{-/-} infectados por *L. braziliensis*, com expressão reduzida ou não de amastinas, apresentaram uma redução considerável na produção de IL-1 β (Figura 9). Dessa forma, é importante considerar que Galectina-3 apresenta um

papel na ativação do inflamassoma de Nlrp3 e na produção de IL-1 β . No entanto, as proporções nas liberações de IL-1 β por diferentes macrófagos foram preservadas. Logo, é possível concluir que a Galectina-3 não desenvolve um papel na indução elevada da ativação de Nlrp3 em função de uma expressão irregular de amastinas (Figura 9).

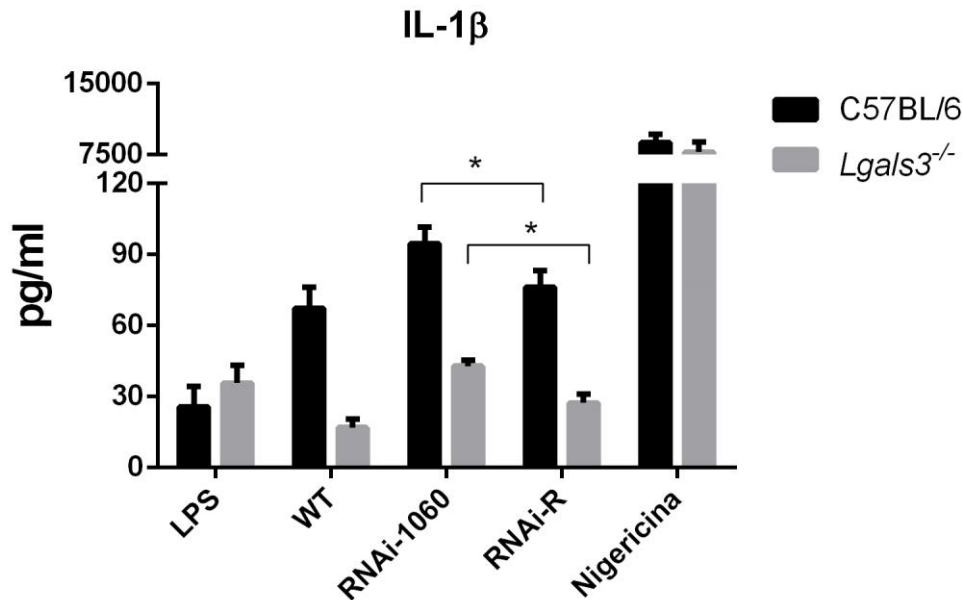


Figura 9. Galectina-3 exerce um papel na produção de IL-1 β em infecções com *L. braziliensis*. Quantificação de IL-1 β por ensaio de ELISA a partir de sobrenadantes de BMDMs de camundongos C57BL/6 selvagens (C57BL/6) ou deficientes para Galectina-3 (*Lgals3*^{-/-}) infectados com promastigotos em fase estacionária de *L. braziliensis* das linhagens WT; RNAi-1060; RNAi R1 – linhagens com expressão reconstituída da expressão das δ -amastinas e Nigericina. Macrófagos estimulados previamente com LPS. Dados representados como média \pm DPM; * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A imunidade inata é um sistema evolutivamente conservado, com elementos cruciais compartilhados entre plantas, invertebrados e mamíferos (BRYANT; MONIE, 2012). Dentre as células da resposta imune inata, o macrófago desenvolve uma série de funções canônicas – fagocitose de microrganismos, células mortas/corpos apoptóticos e liberação de citocinas inflamatórias – e não canônicas – como a participação ativa na manutenção da homeostase e na integridade de tecidos (OKABE; MEDZHITOV, 2016). Com uma grande gama de funções no desenvolvimento de patogenias e na manutenção da homeostase, os macrófagos apresentam papel central durante infecções por microrganismos. Nos macrófagos, acontecem a maior parte das interações entre patógenos hospedeiros em diversas doenças.

No jogo evolutivo entre patógenos e macrófagos, grandes populações e a alta velocidade replicativa conferem uma grande vantagem adaptativa a patógenos unicelulares frente aos hospedeiros. Estudos recentes com drogas antivirais e antibacterianas demonstraram que uma forma eficiente de superar a habilidade adaptativa de patógenos unicelulares ou virais é o uso de coquetéis de drogas, que por sua vez oferecem múltiplos pontos de pressão seletiva (HUGHES; ANDERSSON, 2015). Nesse cenário, os sistemas imunológicos de hospedeiros também desenvolveram estratégias que oferecem múltiplos pontos de pressão seletiva visando neutralizar o efeito da velocidade adaptativa de patógenos. Uma estratégia clássica das células da imunidade inata é a presença de uma diversa gama de receptores reconhedores de padrões (*pattern recognition receptors* - PRR), como os receptores tipo Toll (*Toll like receptors* - TLR), os receptores tipo NOD (*NOD like receptors* - NLR) e os inflamassomas (UEMATSU; AKIRA, 2006). Recentemente, foi demonstrado que além da diversidade de receptores, existem mecanismos nos receptores aptos a oferecer

múltiplas pressões seletivas em um mesmo receptor. Tal mecanismo é a estratégia de reconhecimento multisuperficial (TENTHOREY et al., 2017). Um exemplo dessa estratégia é o reconhecimento estrutural da flagelina bacteriana pelo NAIP5, em que vários sítios do receptor atuam para reconhecer diversos sítios da proteína bacteriana. Dessa forma, mutações pontuais são incapazes de conferir resistência ao patógeno, sendo necessário um conjunto de adaptações complexas para superar um único receptor.

O papel dos PRRs é, portanto, crucial para o controle de infecções e na indução de uma inflamação. Os TLRs são a classe de PRRs com a literatura mais extensa, tendo papel crucial no reconhecimento e na contenção da grande maioria de patógenos (TAKEDA; AKIRA, 2015). A sinalização por TLRs inclui o recrutamento de diferentes moléculas adaptadoras que ativam vários fatores de transcrição, como NF- κ B, IRF3/7 e MAP cinases (NAPETSCHNIG; WU, 2013). Tais fatores de transcrição, induzem a expressão de outros PRRs, como os NLRs, citocinas pró inflamatórias e interferons do tipo 1 (CHEN; JIANG, 2013). Reconhecimento por NLRs ou inflamassomas no citosol intensificam os sinais pró inflamatórios, ativando as células infectadas. Por sua vez, macrófagos e células dendríticas ativadas produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico, que limitam a sobrevivência dos patógenos, conjuntamente com uma grande quantidade de citocinas (LAMKANFI; DIXIT, 2014). Adicionalmente, tais células atuam como apresentadoras de antígenos, ampliando a resposta imune adaptativa.

Nas infecções por *Leishmania*, os PRRs apresentam papéis cruciais na resposta imune. TLR4 é ativado durante infecções com *L. donovani* e, através da sinalização via TLR4-MyD88-IL-12, é bastante efetivo para o controle da carga parasitária (PAUL et al., 2014). Recentemente, em nosso grupo, foi evidenciada a participação do receptor

Nlrp3 em infecções por *Leishmania* spp. A ativação deste receptor leva a uma resposta dependente de ASC que resulta na clivagem de procaspase-1 para caspase-1 ativa, que por sua vez, cliva IL-1 em sua forma ativa. Através do receptor de IL-1 (IL-1R) e de MyD88, a produção de óxido nítrico por NOS2 é induzida e atua no controle dos parasitos pelos macrófagos (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

Por outro lado, patógenos desenvolveram uma série de estratégias que buscam modular ou subverter mecanismo de defesa dos macrófagos (REN et al., 2017), dentre elas estão a inibição da resposta mediada por PRRs (KNUTSON et al., 1998), a modulação da polarização de macrófagos (RICHTER et al., 2013), a regulação da maturação do fagossomo (DUMAS et al., 2015), a modulação do metabolismo celular (DIVANGAHI et al., 2009) e a regulação e da autofagia (ZOU; SHANKAR, 2016).

No caso especial de *Leishmania*, o gênero traça uma história coevolutiva com tetrápodes por pelo menos 100 milhões de anos (AKHOUNDI et al., 2016). Durante esse período, os parasitos desenvolveram um hábito de vida dixênico, apresentando excelente adaptação tanto aos hospedeiros artrópodes quanto aos hospedeiros tetrápodes. Dessa forma, os parasitos do gênero apresentam diversas adaptações aptas a modular e subverter o sistema imune de seus hospedeiros. Os macrófagos estão presentes durante as respostas iniciais e transitórias durante infecções por *Leishmania* spp., e são as células hospedeiras definitivas para tais parasitos. Os parasitos de *Leishmania* spp. possuem uma grande estratégia de evasão, em que as funções microbicidas dos macrófagos são suprimidas ao alternarem-se as vias de sinalização (ISNARD et al., 2015). Ao infectarem os macrófagos, os parasitos secretam uma série de moléculas - como a metaloprotease GP63, lipofosfogicanos (LPG), inibidor de peptidase de serina (ISP), proibitinas e muitas outras - que atuam modulando o

metabolismo celular do macrófago e suas vias pró-inflamatórias (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Neste contexto, acompanhando a evolução do gênero, as amastinas são uma família de glicoproteínas de superfície de tripanossomatídeos que apresentam uma grande diversificação e multiplicação gênica em *Leishmania* spp. (DE PAIVA et al., 2015). Recentemente, foi elucidado a importância das δ -amastinas, uma subfamília de amastinas, para a sobrevivência dos parasitos em macrófagos e para uma adesão funcional adequada à parede do vacúolo parasitóforo (DE PAIVA et al., 2015). Devido a semelhança estrutural das amastinas às claudinas, proteínas que são importantes para junções aderentes entre membranas (GÜNZEL; YU, 2013), criou-se a hipótese de que, possivelmente, as amastinas estariam atuando como proteínas de adesão entre as membranas do parasito e do vacúolo. Dessa forma, as amastinas poderiam estar relacionadas, direta ou indiretamente, à transposição de fatores de virulência dos parasitos para o citoplasma do macrófago e também à integridade vacuolar.

A infecção por parasitos, com expressão irregular de amastinas, leva a uma maior secreção de IL-1 β e a maior ativação de caspase-1, de uma forma dependente de Nlrp3. Existem duas hipóteses mais parcimoniosas para este fato: a primeira, seria um papel das amastinas na regulação da integridade do vacúolo parasitóforo, de tal forma que o comprometimento da membrana afetaria a liberação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs) ao citoplasma. A segunda, seria uma atuação das amastinas, direta ou indiretamente, na liberação de fatores de virulência que subvertem os mecanismos de defesa do macrófago. Como foi observado recentemente, o contato das membranas dos parasitos e dos vacúolos é irregular em infecções com parasitos com expressão silenciada de amastinas, além da presença de

microfissuras nesses vacúolos (DE PAIVA et al., 2015). Desta forma, a primeira hipótese foi melhor desenvolvida ao longo deste estudo.

Para inferir que uma maior liberação de PAMPs de *Leishmania* ativam Nlrp3 seria preciso conhecer por quais mecanismos um macrófago pode detectar tais PAMPs no citoplasma. No entanto, precisamente, os mecanismos envolvidos na ativação do inflamassoma de Nlrp3 por *Leishmania* spp. ainda não foram inteiramente elucidados. Foi demonstrado que receptores de lectina do tipo C, incluindo Dectina-1 e o receptor de manose, funcionam como sensores para PAMPs de *Leishmania* spp. (LEFÈVRE et al., 2013). Tais receptores são críticos para a restrição de parasitos, da mesma forma que a ativação do inflamassoma de Nlrp3 (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Tais receptores ativam as vias de Syk-p47 e ácido araquidônico/NADPH oxidase, respectivamente (LEFÈVRE et al., 2013), que estão envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS). Como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é importante para uma ativação eficiente do inflamassoma (CRUZ et al., 2007), a ativação da cinase Syk pela via da Dectina-1 por PAMPs de *Leishmania* spp. foi associada com a ativação de caspase-1 e a secreção de IL-1 β . Apesar de não estar elucidado se a interação de tais receptores com os PAMPs de *Leishmania* spp. são essenciais para a ativação de Nlrp3, é bastante provável, como exposto, uma correlação entre os dois eventos. Logo, uma eventual desestabilização do vacúolo em função da ausência de amastinas poderia de fato intensificar a liberação de PAMPs para o citoplasma, que se associariam a receptores de lectina do tipo C e receptores de manose, induzindo uma maior ativação do inflamassoma e, conseqüentemente, uma maior ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β .

Recentemente, foi revelada uma ativação não canônica do inflamassoma de Nlrp3 através da ativação do inflamassoma de Caspase-11 por lipofosfoglicanos de

Leishmania spp. (DE CARVALHO et al., 2019). Apesar dos lipofosfoglicanos serem reconhecidos como um PAMP por Caspase-11, o aumento na liberação de IL-1 β persistiu em macrófagos deficientes para Caspase-11 infectados por parasitos com expressão silenciada de amastinas, mesmo existindo uma redução global da secreção de IL-1 β . Desta forma, é plausível assumir que não apenas o LPG, mas também outros PAMPs e DAMPs ligados à infecção por *L. braziliensis* estejam ativando o inflamassoma através de outros receptores, como o de dectina-1. Dados não publicados do nosso grupo indicam um papel semelhante do inflamassoma de Nlrp4 na indução da ativação de Nlrp3. Logo, os experimentos com macrófagos deficientes para Nlrp4 infectados com parasitos com expressão silenciada de amastinas apresentaram resultados semelhantes aos macrófagos deficientes para Caspase-11, apesar de não haver conhecimento de uma molécula de *Leishmania* que ative o inflamassoma de Nlrp4 servindo como um PAMP. No caso em questão, é possível que a secreção de LPG não seja diretamente afetada pela ausência de amastinas, ou que o aumento é devido a secreção de outros PAMPs não relacionados à ativação de Caspase-11 e Nlrp4 no citoplasma.

Além de suas funções fisiológicas, a Galectina-3 possui um papel prático como marcador de lise de vacúolo por patógenos. Em infecções de macrófagos por *Shigella*, *Listeria* e *Salmonella* mutante *sifA*, em que o vacúolo sofre lise, foi demonstrada a formação de aglomerados de Galectina-3 (PAZ et al., 2010). Como a lise é dependente da ligação da Galectina-3 a glicanos que contenham N-acetilactosamina, provenientes da própria célula hospedeira, o modelo foi extrapolado para qualquer infecção por patógeno apto a romper e gerar lise de vacúolo (PAZ et al., 2010).

Os experimentos demonstrados, no presente estudo, demonstraram a eficácia do método para o estudo de lise de vacúolo em infecções por *L. braziliensis*. Por não serem

patógenos tipicamente relacionados com lise de vacúolo, as infecções por *L. braziliensis* resultaram em um número não muito expressivo de eventos de lise de vacúolo. No entanto, como demonstrado anteriormente (DE PAIVA et al., 2015), o silenciamento da expressão das amastinas leva a um contato irregular das membranas dos parasitos e do vacúolo parasitóforo, além da formação de rompimentos pontuais na membrana do vacúolo, um sinal de instabilidade da membrana vacuolar. Logo, como as infecções por parasitos com expressão irregular de amastinas geraram um número significativamente superior de agregados de Galectina-3, é bastante provável que as amastinas estejam relacionadas à manutenção da integridade vacuolar na condição de preservar o meio citoplasmático da célula hospedeira da liberação de PAMPs e DAMPs provenientes dos parasitos, presente no interior do vacúolo parasitóforo.

A Galectina-3 pertence à família das lectinas que possuem uma região reconhecadora de carboidratos, que, no caso das galectinas, permite a ligação de β -galactosídeos, e exercem uma série de funções, tais como adesão celular, ativação de macrófagos, angiogênese, metástase e apoptose (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Recentemente, o estudo das galectinas tem ganhado relevância por funções desempenhadas na resposta imune, em especial em resposta a tripanossomatídeos (DA SILVA et al., 2017). Em infecções por *Leishmania* spp., Galectina-3 auxilia no recrutamento de neutrófilos (BHAUMIK et al., 2013), na regulação da polarização de células T auxiliaadoras (FERMINO et al., 2016), e nas frequências e funções de células T reguladoras CD4⁺, CD25⁺ e Foxp3⁺ (FERMINO et al., 2013).

Outra função atrelada à Galectina-3 em infecções por *Leishmania* spp, em especial *Leishmania major*, é a ação como um PRR apto a reconhecer PAMPs proveniente dos parasitos. Foi demonstrada a interação de Galectina-3 com LPG de *Leishmania major*, mas não com LPGs de *Leishmania donovani* (PELLETIER; SATO,

2002). Tal especificidade de Galectina-3 se deve em parte à alta variabilidade das moléculas de LPG apresentadas nas membranas de diferentes espécies de *Leishmania*. No entanto, o papel de Galectina-3 como um PRR para outros PAMPs das diversas espécies de *Leishmania* permanece desconhecido. Dessa forma, Galectina-3 torna-se um importante candidato como sensor citosólico para PAMPs de *Leishmania* spp. (SATO et al., 2014), conjuntamente com Caspase-11 e dectina-1.

Apesar de macrófagos deficientes para Galectina-3, infectados com parasitos e com expressão silenciada de amastinas, apresentarem uma secreção de IL-1 β em níveis significativamente maiores aos dos macrófagos deficientes para Galectina-3 infectadas com parasitos com expressão regular de amastinas, houve uma redução global da secreção de IL-1 β nas infecções por *L. braziliensis*. Um possível papel de Galectina-3 na ativação do inflamassoma de Nlrp3 em infecções por *Leishmania* spp. ainda não foi elucidado na literatura, mas ambas as moléculas estão relacionadas em outros quadros inflamatórios. Em lesões colestáticas do fígado, a ativação de Nlrp3 é dependente de Galectina-3 (TIAN et al., 2016). Em macrófagos hepáticos, ambas as proteínas se associam após indução por ácido desoxicólico (TIAN et al., 2016). Estudos em modelos de colite ulcerativa também demonstraram associação da ativação de Nlrp3 e Galectina-3 *in vivo*, e *in vitro*, onde macrófago colônicos *Galectina-3*^{-/-} tratados com LPS e Dextran sulfato de sódio (DSS) apresentaram uma redução na ativação de Nlrp3 (SIMOVIC MARKOVIC et al., 2016). No entanto, no modelo de colite ulcerativa induzida por DSS, a redução na ativação NLRP3 foi em função da redução nos níveis de mRNA de Nlrp3 e IL-1 β expressos nos macrófagos e no tecido do cólon (SIMOVIC MARKOVIC et al., 2016). Se a redução nos níveis de IL-1 β em macrófagos *Galectina-3*^{-/-} infectados com *L. braziliensis* se deve a uma interação direta entre Galectina-3 e

Nlrp3 ou se deve a uma relação transcricional de Nlrp3 em função de Galectina-3 permanece incerto e necessita de estudos posteriores.

Em conjunto, esses dados demonstram a complexidade nas relações parasito-hospedeiro, em que diversos mecanismos de defesa e reconhecimentos de patógenos operam em conjunto visando reconhecer e controlar possíveis invasores, enquanto que diversas proteínas e fatores de virulência operam em conjunto para sobrepor ou subverter mecanismos de defesa. As amastinas, junto com outros fatores de virulência, como os LPGs ou a GP63 de *Leishmania* atuam em diferentes níveis de forma a reduzir a resposta inflamatória dos macrófagos, o que induziria sua morte e o controle dos parasitos. Enquanto os macrófagos através, possivelmente, da Galectina-3 e de outros sensores, como TLR4, Dectina-1 e Caspase-11, visam ativar a expressão de NOS2 e outros mecanismos para o controle dos parasitos.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

As amastinas exercem papel regulador negativo na ativação de Nlrp3, de uma forma independente de Caspase-11 e Nlrc4, apesar desses inflamassomas contribuírem para a produção de IL-1 β em macrófagos infectados por *L. braziliensis*. As amastinas parecem atuar na manutenção da integridade vacuolar, o que pode justificar a modulação negativa de Nlrp3, uma vez que a instabilidade vacuolar pode induzir liberação de PAMPs para o citoplasma. Galectina-3 atua na secreção total de IL-1 β em infecções de macrófagos por *L. braziliensis*, mas não exerce papel na modulação da ativação do inflamassoma de Nlrp3 pelas amastinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. [s.l: s.n.].
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- AMSTAD, P. A. et al. Detection of caspase activation in situ by fluorochrome-labeled caspase inhibitors. **BioTechniques**, v. 31, n. 3, p. 608–616, 2001.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, 2007.
- BHAUMIK, P. et al. Galectin-3 Facilitates Neutrophil Recruitment as an Innate Immune Response to a Parasitic Protozoa Cutaneous Infection. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 630–640, 2013.
- BOYDEN, E. D.; DIETRICH, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. **Nature Genetics**, 2006.
- BRYANT, C. E.; MONIE, T. P. Mice, men and the relatives: Cross-species studies underpin innate immunity. **Open Biology**, v. 2, n. APRIL, 2012.
- BÜRCKSTÜMMER, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. **Nature Immunology**, 2009.
- CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, 2008.
- CHEN, H.; JIANG, Z. The essential adaptors of innate immune signaling. **Protein and Cell**, v. 4, n. 1, p. 27–39, 2013.
- CHEN, Y. J. et al. Galectin-3 Enhances Avian H5N1 Influenza A Virus-Induced Pulmonary Inflammation by Promoting NLRP3 Inflammasome Activation. **American Journal of Pathology**, v. 188, n. 4, p. 1031–1042, 2018.
- CHURCH, L. D.; COOK, G. P.; MCDERMOTT, M. F. **Primer: Inflammasomes and interleukin 1 β in inflammatory disorders** *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2008.
- CONTRERAS, I. et al. Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription Factor AP-1 Is Mediated by the Parasite Metalloprotease GP63. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 1–24, 2010.
- CRUZ, C. M. et al. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2871–2879, 2007.

- DA SILVA, A. A. et al. Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–9, 2017.
- DE CARVALHO, R. V. H. et al. Leishmania Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Reports**, v. 26, n. 2, p. 429–437.e5, 2019.
- DE PAIVA, R. M. C. et al. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2015.
- DENIAU, M. et al. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annal of Tropical Medicine & Parastology**, v. 97, n. 1, p. 115–133, 2002.
- DIVANGAHI, M. et al. Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. **Nature Immunology**, v. 10, n. 8, p. 899–906, 2009.
- DUMAS, A. et al. The HIV-1 protein Vpr impairs phagosome maturation by controlling microtubule-dependent trafficking. **Journal of Cell Biology**, v. 211, n. 2, p. 359–372, 2015.
- DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: An open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, n. 4, p. 616–635, 2006.
- FERMINO, M. L. et al. Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and influences the course of *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 7, p. 1806–1817, 2013.
- FERMINO, M. L. et al. Lack of galectin-3 increases Jagged1/Notch activation in bone marrow-derived dendritic cells and promotes dysregulation of T helper cell polarization. **Molecular Immunology**, v. 76, p. 22–34, 2016.
- GOMEZ, M. A. et al. *Leishmania* GP63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases. **Science Signaling**, v. 2, n. 90, 2009.
- GONÇALVES, A. C. et al. The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection. **Immunology**, 2017.
- GREGORY, D. J. et al. A novel form of NF- κ B is induced by *Leishmania* infection: Involvement in macrophage gene expression. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 1071–1081, 2008.
- GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130 Suppl, n. 2005, p. S27–S35, 2005.
- GÜNZEL, D.; YU, A. S. L. **Claudins and the modulation of tight junction permeability**. [s.l: s.n.]. v. 93
- HAYDAY, A. et al. **Intraepithelial lymphocytes: Exploring the Third Way in immunology** *Nature Immunology*, 2001.
- HE, W. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell research**, v. 25, n. 12, p. 1285–98, 2015.
- HONDA, K.; TAKAOKA, A.; TANIGUCHI, T. **Type I Inteferon Gene Induction by**

the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors *Immunity*, 2006.

HOTEZ, P. J. et al. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. *PLoS Medicine*, v. 3, n. 5, p. 576–584, 2006.

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Evolutionary consequences of drug resistance: Shared principles across diverse targets and organisms. *Nature Reviews Genetics*, v. 16, n. 8, p. 459–471, 2015.

INOHARA, N. et al. NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 2005.

ISNARD, A. et al. Impact of Leishmania Infection on Host Macrophage Nuclear Physiology and Nucleopore Complex Integrity. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 1–26, 2015.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. **Control of adaptive immunity by the innate immune system** *Nature Immunology*, 2015.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. *Molecular Biology and Evolution*, v. 27, n. 1, p. 33–45, 2010.

JULIANA, C. et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 43, p. 36617–36622, 2012.

KARIMKHANI, C. et al. Global burden of cutaneous leishmaniasis: A cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 5, p. 584–591, 2016.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990.

KNUTSON, K. L. et al. Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes: Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 1, p. 645–652, 1998.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, 2014.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 6, p. 397–411, 2013.

LEFÈVRE, L. et al. **The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to Leishmania infantum.** *Immunity. Anais...*2013

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nature medicine*, v. 19, n. 7, p. 909–15, 2013.

- MALIK, A.; KANNEGANTI, T.-D. Inflammasome activation and assembly at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 23, p. 3955–3963, 2017.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228–232, 2006.
- MARTINON, F. Detection of immune danger signals by NALP3. **Journal of Leukocyte Biology**, 2007.
- MIAO, E. A. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. **Nature Immunology**, 2006.
- NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NF- κ B signaling. **Annual review of biophysics**, v. 42, n. March, p. 443–68, 2013.
- NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012.
- NOVAIS, F. O. et al. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology Fernanda. **J Invest Dermatol.**, v. 27, n. 6, p. 316–324, 2015.
- OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Tissue biology perspective on macrophages. **Nature Immunology**, v. 17, n. 1, p. 9–17, 2016.
- OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.
- PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, 2009.
- PAUL, J. et al. TLR4-mediated activation of MyD88 signaling induces protective immune response and IL-10 down-regulation in *Leishmania donovani* infection. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 51, n. 6, p. 531–541, 2014.
- PAZ, I. et al. Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 530–544, 2010.
- PELLETIER, I.; SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17663–17670, 2002.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.
- PY, B. F. et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. **Molecular Cell**, v. 49, n. 2, p. 331–338, 2013.
- RATHINAM, V. A. K. et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. **Nature Immunology**, 2010.
- RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2012.
- REN, Y. et al. Immune evasion strategies of pathogens in macrophages: The potential for limiting pathogen transmission. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 21, p. 21–

40, 2017.

RICHTER, K. et al. Macrophage and T Cell Produced IL-10 Promotes Viral Chronicity. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 11, 2013.

RIERA, C. et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Island, Spain) by different diagnostic methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 102–110, 2004.

RIERA ROMO, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, D.; CASTILLO FERRER, C. Innate immunity in vertebrates: An overview. **Immunology**, v. 148, n. 2, p. 125–139, 2016.

ROCHETTE, A. et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 205–220, 2005.

SARVESTANI, S. T.; MCAULEY, J. L. **The role of the NLRP3 inflammasome in regulation of antiviral responses to influenza A virus infection** **Antiviral Research**, 2017.

SATO, S. et al. Role of Galectin-3 in the Initial Control of *Leishmania* Infection. **Critical Reviews in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 147–175, 2014.

SEGOVIA, J. A. et al. NLRP3 is a critical regulator of inflammation and innate immune cell response during *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Infection and Immunity**, 2018.

SHI, F.; KOUADIR, M.; YANG, Y. NALP3 inflammasome activation in protein misfolding diseases. **Life Sciences**, 2015.

SHIO, M. T. et al. PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by *Leishmania* Zinc-Metalloprotease during Infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003868, 2015.

SILVERMAN, J. M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 6, p. 842–852, 2010.

SIMOVIC MARKOVIC, B. et al. Galectin-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 β in macrophages. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 10, n. 5, p. 593–606, 2016.

SUN, Q.; SCOTT, M. J. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 961–967, 2016.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like Receptors. **Current Protocols in Immunology**, v. 109, n. 1, p. 14.12.1-14.12.10, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TEIXEIRA, S. M. R. et al. A Differentially Expressed Gene Family Encoding “Amastin”, a Surface Protein of *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. **The Journal of Biological C**

hemistry, v. 269, n. 32, p. 20509–20516, 1994.

TENTHOREY, J. L. et al. The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 888–893, 2017.

TIAN, J. et al. Galectin-3 regulates inflammasome activation in cholestatic liver injury. **FASEB Journal**, v. 30, n. 12, p. 4202–4213, 2016.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

URIBE, C. et al. **Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review** *Veterinarni Medicina*, 2011.

WARREN, M. K.; VOGEL, S. N. Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 134, n. 2, p. 982–9, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

WU, Y. et al. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 345–357, 2000.

XU, H. et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pylrin inflammasome. **Nature**, 2014.

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Dermatol**, v. 29, p. 464–467, 2004.

ZENEWICZ, L. A.; SHEN, H. **Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview** *Microbes and Infection*, 2007.

ZOU, J.; SHANKAR, N. The opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* resists phagosomal acidification and autophagy to promote intracellular survival in macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 831–843, 2016.