UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – FMRP

PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

# O PAPEL DE GASDERMINA-D E DA MORTE CELULAR NA RESPOSTA IMUNE CONTRA *LEGIONELLA LONGBEACHAE* EM MODELO MURINO DA DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS

SAMUEL DOS SANTOS OLIVEIRA

RIBEIRÃO PRETO – SP

2022

**SAMUEL DOS SANTOS OLIVEIRA**

# O PAPEL DE GASDERMINA-D E DA MORTE CELULAR NA RESPOSTA IMUNE CONTRA *LEGIONELLA LONGBEACHAE* EM MODELO MURINO DA DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, na área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2022**

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.

Oliveira, Samuel dos Santos

O papel de Gasdermina-D e da morte celular na resposta imune contra *Legionella longbeachae* em modelo murino da doença dos legionários, 2022. 58 p.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, na área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

1. GSDMD. 2. Óxido Nítrico. 3. Inflamassoma.

SAMUEL DOS SANTOS OLIVEIRA

O papel de Gasdermina-D e da morte celular na resposta imune contra *Legionella longbeachae* em modelo murino da doença dos legionários

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, na área de Concentração: Imunologia

Aprovado em: _____ de _____ de _____

**Banca examinadora**

**Prof (a). Dr (a).** _____

**Instituição:** _____

**Julgamento:**_____

**Prof (a). Dr (a).** _____

**Instituição:** _____

**Julgamento:** _____

**Prof (a). Dr (a).** _____

**Instituição:** _____

**Julgamento:** _____

Dedico este trabalho a todos os indestrutíveis jovens LGBTQIA+ que lutam diariamente para ter suas vidas e dignidade asseguradas. Estes que muitas vezes tem seus sonhos ceifados pelo machismo patriarcal e pela LGBTfóbica que predomina em nossa sociedade.

**AGRADECIMENTOS:**

Agradeço ao Professor Dr. Dario Simões Zamboni pela confiança em me receber em seu laboratório e pelos valiosos ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Marco Ataíde por ter sido meu parceiro de bancada e de discussões neste processo. Nossas conversas certamente foram cruciais para aprimoramento do meu senso crítico, bem como ajudaram a direcionar os rumos do presente trabalho. Agradeço também ao Dr. Augusto Gonçalves pela paciência em me ensinar a manipular a *Legionella* e a realizar meus primeiros experimentos.

Aos integrantes da banca examinadora pela disponibilidade para avaliar este trabalho e contribuir para seu aperfeiçoamento.

Aos meus pais, Rosa e Beto por serem meu porto seguro, por estarem sempre comigo, por terem batalhado para que eu tivesse educação de qualidade e dignidade e pelo vosso amor incondicional.

Aos colegas de laboratório pelas discussões, pelas conversas sobre os mais variados assuntos. Pelos mimos de aniversário e principalmente por terem me acolhido em um momento extremamente difícil da minha vida que foi a chegada em uma cidade nova localizada a mais de 1000 km de distância da minha cidade natal.

Agradeço ao grupo COVID (Tamara, Keyla, Leitim, Amanda, Letícia Almeida, Adriene e Débora) pela parceria que construímos para produzir um estudo tão relevante para a ciência mundial. Isto em um período nebuloso, cheio de dificuldades, mas também cheio de aprendizado.

Agradeço aos meus amigos, Bruna, Amanda Becerra, Tamara, Camila, Letícia Lopes e Kleyson por tornarem todo este período mais leve e agradável (do terceirão pra vida). E um agradecimento especial ao Brito Caetité que estudou para seleção do mestrado comigo e me ajudou a ingressar aqui.

Não posso esquecer de citar a equipe técnica do Zamboni Lab, em especial Amanda, Débora e Maira, pelo esforço incessante para manter um laboratório deste porte funcionando em perfeita harmonia. Ainda a Ana Cristine por todo o auxílio burocrático (nunca me esquecerei que você veio doente para a USP apenas para fazer a implementação de nossas bolsas) e a Denise pelo apoio com as citometrias.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID) pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e concessão de bolsa de estudo (CNPq).

**Gratidão! Namaskar! Gracias! Thanks!**

# RESUMO

Oliveira, Samuel dos Santos. **O papel de Gasdermina-D e da morte celular na resposta imune contra *Legionella longbeachae* em modelo murino da doença dos legionários**. 2022. 60f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A resposta imune inata a bactérias do gênero *Legionella* vem sendo amplamente estudada nas últimas décadas, devido principalmente a grande quantidade de espécies do gênero capazes de provocar doença em humanos. Em países do sudeste asiático a *Legionella longbeachae* é extremamente relevante para a clínica por ser o agente etiológico de aproximadamente 50% dos casos de Legioneloses na região. Pouco se sabe sobre a resposta imunológica contra *L. longbeachae*, fato que se deve principalmente a recente descoberta da interação entre a bactéria e humanos, bem como a dificuldade da maioria dos países em detectar esta bactéria em pacientes, o que é crítico para a subnotificação de casos. Dentre os principais estudos realizados visando identificar componentes da imunidade inata relevantes para o controle da infecção, destacam-se dois trabalhos publicados na última década, um evidenciando o papel protetor do IFNγ e o outro, publicado por nosso grupo de pesquisa, apontando que as caspases inflamatórias 1 e 11 são dispensáveis para o controle da mortalidade causada por essa bactéria. No entanto, ainda não se sabe o que ocorre a jusante do engajamento do receptor de IFNγ, bem como outros componentes do sistema imune que operam na resposta contra a bactéria. Neste trabalho, nos demonstramos que a atividade do óxido nítrico está associada a uma redução da produção de IL-12 que leva a um agravamento da infecção por *L. longbeachae*. Adicionalmente, nossos estudos indicam que a expressão de NOS2 em neutrófilos de parece ser regulada pela morte celular piroptótica e que a piroptose, dependente de GSDMD é um acontecimento essencial para a imunidade à bactéria. Finalmente, mostramos que separadamente, os inflamassomas de AIM2 e NLRP3 são dispensáveis nesta resposta e que a clivagem de GSDMD em resposta a *L. longbeachae* ocorre mesmo na ausência de Caspase-1 e Caspase-11. Em conjunto, nossos dados sugerem que a morte celular dependente de GSDMD regula a produção de NO em neutrófilos para proteção do hospedeiro frente a infecção por *L. longbeachae*.



Óxido Nítrico, morte celular, Gasdermina-D, Legionelose

## ABSTRACT

Oliveira, Samuel dos Santos. **The role of gasdermin-D and cell death in the immune response to *legionella longbeachae* in a murine model of legionnaires' disease** 2022. 60f. Dissertation (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The innate immune response to bacteria of the genus *Legionella* has been widely studied in recent decades, mainly due to the large number of species of the genus capable of causing disease in humans. In Southeast Asian countries, *Legionella longbeachae* is extremely relevant to the clinic as it is the etiologic agent of approximately 50% of Legionellosis cases in the region. Little is known about the immune response against *L. longbeachae*, which is mainly due to the recent discovery of the interaction between the bacterium and humans, as well as the difficulty of most countries in detecting this bacterium in patients, which is critical for underreporting. of cases. Among the main studies carried out to identify components of innate immunity relevant to infection control, two studies published in the last decade stand out, one evidencing the protective role of IFNγ and the other, published by our research group, pointing out that inflammatory caspases-1 and 11are unnecessary to control the mortality caused by this bacterium. However, it is not yet known what happens downstream of the IFNγ receptor engagement, as well as other components of the immune system that operate in the response against the bacteria. In this work, we demonstrated that nitric oxide activity is associated with a reduction in IL-12 production that leads to an aggravation of *L. longbeachae* infection. Additionally, our studies indicate that NOS2 expression in neutrophils appears to be regulated by pyroptotic cell death and that GSDMD-dependent pyroptosis is an essential event for bacterial immunity. Finally, we show that separately, AIM2 and NLRP3 inflammasomes are dispensable in this response and that GSDMD cleavage in response to *L. longbeachae* occurs even in the absence of Caspase-1 and Caspase-11. Taken together, our data suggest that GSDMD-dependent cell death regulates NO production in neutrophils for host protection against L. longbeachae infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inflamassomas ativados em resposta a *L. pneumophila*.....18

Figura 2 – Estrutura do poro de GSDMD.....20

Figura 3 – Vias de morte celular dependentes de NLRC4.....22

Figura 4 – Estratégia de gates de citometria.....32

Figura 5. Monócitos e neutrófilos expressão elevados níveis de NOS2 em resposta a infecção por L. longbeachae.....34

Figura 6. O óxido nítrico favorece replicação de L. longbeachae e a imunopatogênese da doença dos Legionários.....35

Figura 7. Animais deficientes para a produção de NO têm forte resposta de IL-12 em resposta a L. longbeachae e baixa produção de alarminas.....36

Figura 8. Animais deficientes para produção de NO apresentam leve redução na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) em resposta a L. longbeachae.....37

Figura 9. Expressão de NOS2 em neutrófilos é impulsionada pela ausência de GSDMD.....39

Figura 10. A morte celular piroptótica e os inflamassomas desempenham um papel crítico na imunidade a L. longbeachae.....40

Figura 11. A GSDMD é o efetor de morte celular chave no combate a L. longbeachae.....41

Figura 12. O inflamassoma de AIM2 é dispensável na reposta imune a L. longbeachae.....43

Figura 13. Embora atue no controle da replicação bacteriana o inflamassoma de NLRP3 também é dispensável na reposta imune a L. longbeachae .....44

Figura 14. Macrófagos derivados de Medula óssea (BMDMs) primados promovem clivagem de GSDMD em resposta a infecção por L. longbeachae (MOI: 10), mesmo na ausência das caspasses 1 e 11.....45

Figura 15. Resumo .....51

"*You held me down, but I got up [...]*
*I went from zero, to my own hero*."

(katy perry)

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO** ..... **13**

**2. HIPOTESES** ..... **26**

**3. OBJETIVOS:** ..... **27**

3.1. OBJETIVO GERAL ..... 27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: ..... 27

**4. MATERIAIS E MÉTODOS** ..... 28

4.1. ANIMAIS ..... 28
4.2. MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMDMS) ..... 28
4.3. CULTURA E PREPARO DE BACTÉRIAS ..... 29
4.4. QUANTIFICAÇÃO DE NETS ..... 29
4.5. WESTERN BLOTTING ..... 29
4.6. ENSAIOS DE REPLICAÇÃO IN VIVO ..... 30
4.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEINAS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR ..... 31
4.8. ENSAIO DE MORTALIDADE ..... 31
4.9. CITOMETRIA DE FLUXO ..... 31

**5. RESULTADOS** ..... 34

5.1. O ÓXIDO NÍTRICO É PRODUZIDO EM ALTOS NÍVEIS POR CÉLULAS MIELÓIDES E É DETRIMENTAL NA INFECÇÃO POR L. LONGBEACHAE. ..... 34
*5.2.* A GSDMD É O EFETOR DE MORTE CELULAR PIROPTÓTICA CHAVE NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR L. LONGBEACHAE. ..... 39

**6. DISCUSSÃO** ..... 48

**7. CONCLUSÃO** ..... 53

**8. REFERÊNCIAS** ..... 54

# 1. INTRODUÇÃO

Todos os organismos, sejam eles unicelulares ou pluricelulares constituem nichos ecológicos que podem ser habitados por microrganismos, podendo interagir de forma harmônica, como é o caso de uma série de bactérias comensais que colonizam o intestino dos metazoários e auxiliam na absorção de nutrientes. Quando a interação gera prejuízos para o hospedeiro, tem-se uma interação desarmônica, como observado na infecção de bactérias por bacteriófagos que provocam a lise da célula hospedeira, ou na infecção de humanos por Vírus da imunodeficiência Humana (HIV) que infecta e mata células de defesa $CD4^{+}$. Todo este grupo de colonizadores capazes de causar malefícios ao seu hospedeiro são chamados de patógenos (MEDZHITOV, 2007).

As interações entre patógenos e hospedeiros contribuem para moldar a diversidade genética de ambos os organismos, sendo esta variabilidade matéria prima para a seleção natural que age selecionando nos hospedeiros, mecanismos que o confira resistência a infecções, bem como no patógeno, favorecendo a fixação de caraterísticas que o possibilite evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro, estabelecer uma infecção e deixar descendentes (SIRONI, et al, 2015).

Desde o surgimento das primeiras células eucarióticas, há cerca de 1,7 bilhões de anos, houve a seleção de uma grande diversidade de mecanismos capazes de assegurar a homeostase, integridade e sobrevivência celular a infecções por patógenos (PALUDAN, et al, 2021). Alguns desses mecanismos estão prontos para responder, mesmo antes da exposição ao estresse e sua atividade é denominada resposta imune inata, segmento da resposta imunológica, com variações de complexidade, estrutura e fisiologia, presente em todos os seres vivos (BUCHMANN, 2014).

A imunidade inata dispõe de uma gama de componentes celulares e moleculares que fornecem o combate inicial contra organismos invasores de diferentes grupos taxonômicos, como bactérias, fungos, protozoários, vírus e alguns metazoários. Este "braço" do sistema imune em mamíferos é constituído por três componentes principais: as barreiras físicas e químicas fornecidas pelos epitélios de revestimento, estruturas com células organizadas de forma justaposta, repletas de defensinas que dificultam a entrada de patógenos em tecidos internos (PALUDAN, et al, 2021); os componentes celulares constituídos por células com diferentes especialidades como fagocitose e degradação de patógenos em fagolisossomos, liberação de citocinas e quimiocinas que auxiliam no recrutamento de mais células imunes para o sítio de infecção (quimiotaxia e diapedese), morte de células infectadas e eliminação de nicho replicativo, ativação e modulação da atividade de linfócitos da imunidade adaptativa e depuração dos tecidos lesados (SMITH, et al, 2019); e as proteínas solúveis, como colectinas, pentraxinas, ficolinas e o sistema complemento, presentes em fluidos extracelulares, capazes de matar diretamente os patógenos promovendo sua lise, atuar na remoção de imunocomplexos da circulação, na promoção de inflamação ou atuando como opsoninas, facilitando a fagócitos do patógeno por células fagocíticas do hospedeiro (DUNKELBERGER & WEN-miao SONG, 2010; RICKLIN, et al, 2010; ALUDAN, et al, 2021)

O sistema imunológico tem a capacidade de reconhecer e responder a moléculas estranhas e de tolerar moléculas próprias. Suas células reconhecem uma série de constituintes estruturais e produtos metabólicos de micróbios, sendo estes componentes exclusivos dos microrganismos e ausentes nas células hospedeiras, como o Lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, a flagelina de bactérias flageladas, o RNA de dupla fita de alguns vírus, dinucleotídeos CpG não metilados presente no DNA de bactérias e entre outros. Estes componentes

conservados nos patógenos, ausentes na célula hospedeira e passíveis de reconhecimento pelas células da imunidade inata são chamados de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (DANYANG & MINGHUA, 2021).

Em alguns contextos, estímulos e moléculas do hospedeiro podem ser reconhecidos pelas células da imunidade inata. Lesões de membrana plasmática causadas por vírus em ciclo lítico de replicação, ou bactérias intracelulares, por exemplo, levam ao efluxo de potássio e deposição de ATP no meio extracelular. O desequilíbrio iônico, o ATP extracelular bem como outros sinais indica dano e são capazes de induzir uma resposta imune. Esses sinais são denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (SWANSON, et al, 2019).

A detecção desses PAMPs e DAMPs é realizada principalmente por macrófagos residentes via receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), estas moléculas, embora tenham uma diversidade limitada, possuem uma alta eficiência no reconhecimento de diferentes classes de patógenos (CHOVATIYA& MEDZHITOV, 2014). Elas estão espalhadas por diferentes localizações celulares, como na membrana citoplasmática, onde ocorre o reconhecimento de patógenos extracelulares, mas também em endossomos e no citoplasma, sendo estes mais envolvidos com o reconhecimento de patógenos intracelulares (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). É importante ressaltar que os PRRs não reconhecem seus alvos de forma idêntica, deste modo, variações em determinadas estruturas presentes em diferentes cepas, ou até mesmo espécies, de microrganismos permanecem tendo um padrão molecular comum que é conservado entre diferentes grupos de patógenos, o que dificulta a evasão do patógeno ao reconhecimento pelos PRRs via mutações gênicas (MEDZHITOV, 2001).

Os PRRs podem ser agrupados nas famílias: receptores semelhantes a Toll (TLRs), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo RIG (RLRs) (LAVELLE,

et al, 2010). Os TLRs são uma vasta família de receptores constituídos por um domínio extracelular LRR e um domínio TIR (presente também em receptores da família IL-1R) separados por uma região transmembranar. Estes sensores reconhecem uma ampla diversidade de PAMPs, como RNA de fita dupla, LPS, DNA de fita simples e entre outros. A depender do estímulo, o respectivo TLR ativado pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias via NF-κB ou induzir estado antiviral via Fatores reguladores de Interferons IRFs (MEDZHITOV, 2001; DANYANG & MINGHUA, 2021).

Os receptores tipo RIG (RLRs) são receptores citoplasmáticos compostos por dois domínios CARDs, um domínio central com atividade de helicase/ATPase e um domínio regulador C-terminal. Esa família é extremamente relevante na resposta a infecções virais, posto que reconhecem o RNA de dupla fita de alguns vírus ou o RNA de fita dupla formado transientemente durante a replicação de vírus que tem RNA de fita simples como material genético. Sua expressão é elevada durante infecções virais e sua ativação leva a indução de IFN tipo I e outros genes associados a ativação de estado antiviral (TAKEUCHI & AKIRA, 2010; REHWINKEL & GACK, 2020; DANYANG & MINGHUA, 2021)

Os receptores tipo NOD (NLRs) também compreendem uma família de receptores citosólicos que são capazes de identificar diretamente componentes microbianos presentes no citoplasma da célula hospedeira ou DAMPs ocasionados pela presença do patógeno, como a flagelina, ATP extracelular, cristais de urato monossódico e efluxo de potássio. Estes receptores são constituídos por um domínio central de ligação de nucleotídeo (NBD), uma região C-terminal com repetições ricas em Leucina (LRRs) e um domínio N-terminal variável, que abriga motivos de ligação a proteínas, como CARD, PYD e BIRs (MASCARENHAS & ZAMBONI, 2016; TAKEUCHI & AKIRA, 2010; DANYANG & MINGHUA, 2021).

A família de receptores NLR é dividida em três subfamílias, NODs, NLRPs e NAIPs/NLRC4, estas duas últimas, juntamente com o sensor de DNA citoplasmático AIM2 são cruciais para a montagem dos inflamassomas, plataformas de alto peso molecular que medeiam a ativação de caspases inflamatórias. O complexo inflamassoma é basicamente constituído por um sensor, uma molécula adaptadora e Caspase-1 (MARTINON, et al, 2002; BROZ; DIXIT, 2016).

Os inflamassomas vem sendo bastante estudados, desde o uso do termo pela primeira vez em 2002 por Tschopp e colaboradores, milhares de artigos foram publicados visando entender seus componentes, estrutura e funcionalidade através da utilização de diversos modelos. Dentre os quais a *Legionella pneumophila* merece destaque devido a sua capacidade de ativar múltiplos inflamassomas em uma única célula (Fig. 1) (MASCARENHAS & ZAMBONI, 2016).

A *L. pneumophila* é uma bactéria Gram-negativa e flagelada, ela é um patógeno intracelular facultativo que tem como hospedeiro natural diversas espécies de ameba de vida livre, incluindo *Acanthamoeba castellanii* (RICHARDS, et. al., 2013). A bactéria foi identificada após um surto de pneumonia grave ocorrido em 1976, durante uma reunião anual de participantes da Legião da América, ocorrida na Filadélfia – EUA. Cento e oitenta e dois pacientes foram acometidos pela doença, dentre os quais 29 (16%) vieram a óbito (FRAZER, *et al*., 1977; PHIN, *et al*., 2014).

Os inflamassomas de NAIP5/NLRC4, de AIM2, de Caspase 11 e NLRP3 são os principais envolvidos no reconhecimento da *L. pneumophila*. A flagelina bacteriana induz a ativação dos sensores NAIP5 e NAIP6 em camundongos e NAIP em humanos (AMER, et. al. 2006; TENTHOREY, 2017), este processo induz o recrutamento e a oligomerização do NLRC4, este recruta Caspase-1 e promove sua clivagem (ZAMBONI, et. al. 2006). O inflamassoma de Caspase-11 é ativado em resposta ao LPS bacteriano, sua ativação está

intimamente associada a ativação de NLRP3, uma vez que induz formação de poros na membrana e efluxo de potássio, gatilho para a ativação do NLRP3, que também recruta ASC, por meio de seu domínio pririna, que por sua vez recruta e ativa Caspase-1, via domínio CARD (**Fig. 1**) (MASCARENHAS & ZAMBONI, 2016).

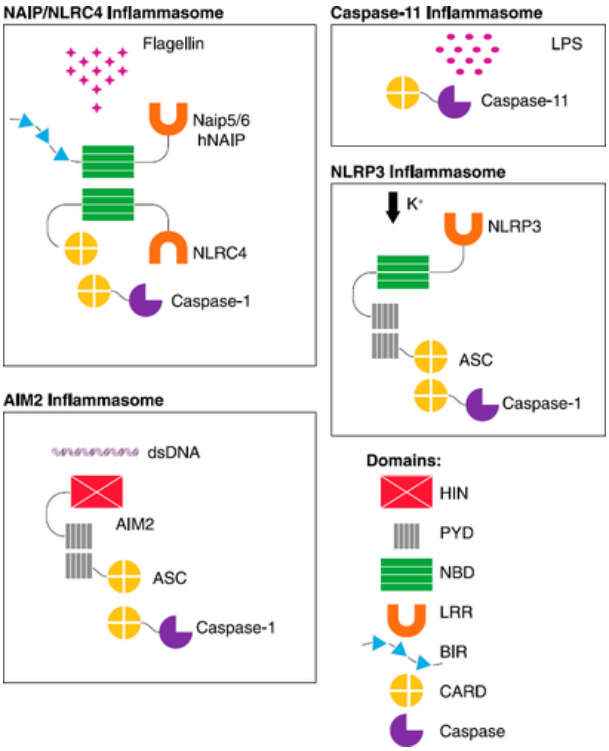


**Figura 1. Inflamassomas ativados em resposta a *L. pneumophila*.** Múltiplos inflamassomas são ativados em resposta a infecção por *L. pneumophila*. A flagelina bacteriana é reconhecida pelo NAIP5 e NAIP6, a ativação destes sensores leva ao recrutamento de NLRC4, proporcionando a ativação de Caspase 1. Já o LPS presente na parede bacteriana ativa a Caspase 11, este processo leva a formação de poros na membrana plasmática, o enfluxo de potássio e a ativação não canônica do inflamassoma de NLRP3. Enquanto o AIM2 é ativado em resposta ao DNA de dupla da *L. pneumophila* liberado encontrado no citoplasma. Sua ativação leva ao recrutamento de ASC e ativação de Caspase 1 (MASCARENHAS & ZAMBONI, *Journal of Leukocyte Biology*, 2016).

O inflamassoma de AIM2 é ativado pela presença de DNA de dupla fita bacteriano no citoplasma, sua ativação promove o recrutamento e associação ao ASC, via ligação homotípica de domínios pirina, o ASC expõe seu domínio CARD, recrutando e clivando Caspase 1, também já foi demonstrado que o AIM2 tem a capacidade de induzir ativação

não canônica de NLRP3 via formação de poros através da Caspase-1 ativa, mas não clivada (CUNHA, et al, 2013).

Após o recrutamento da pró-caspase-1 (forma inativa da protease) pelas proteínas adaptadoras presentes nos inflamassomas, esta protease é clivada em sua forma biologicamente ativa, caspase-1. A caspase-1 ativa promove a clivagem e ativação da pró-IL-1β e da pró-IL-18 em IL-1β e IL-18, respectivamente (BROZ; DIXIT, 2016). Estas citocinas, ao serem liberadas, ativam o endotélio, induzindo aumento da expressão de moléculas de adesão e facilitando o recrutamento de mais células imunes para o sítio infeccioso, bem como induzem a produção de Óxido Nítrico (NO) via Óxido Nítrico Sintase induzida (NOS2) e de prostaglandinas, via Cicloxigenase-2 (COX-2), processos importantes na promoção de inflamação e dor, além de atuar na ativação de células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ (DINARELLO, 2009).

Miao e colaboradores (2010) identificaram a participação da caspase-1 ativada através do reconhecimento da flagelina bacteriana pelo NLRC4 na indução de piroptose, uma forma inflamatória de morte celular, ocorrida nas células infectadas, importante para a eliminação do nicho replicativo. A Gasdermina-D (GSDMD) foi identificada como o principal efetor desta via de morte celular. Sua clivagem é mediada pela ação dos inflamassomas canônico ou não canônico em humanos e camundongos, sendo substrato para as caspases inflamatórias 1, 4, 5 e 11 (SHI, *et al*, 2015; BROZ, 2015; LIU, *et al*, 2019; GAO, *et al*, 2022). Mais recentemente foi demonstrado que a Caspase-8 também consegue cumprir esta função (SARHAN, *et al*, 2018; ORNING, *et al*, 2018)

A GSDMD contém domínios N-terminais (NTD) responsáveis por se associar a membrana plasmática para formar poros e levar a lise da célula, enquanto seus domínios C-terminais (CTDs) atuam inibindo a atividade citolítica do NTD (AGLIETTI, et al, 2016; LIU, et al, 2018; LIU, et al, 2019 XIA, et al, 2021). O poro de GSDMD é

composto por 33 subunidades de NTDs e possui diâmetro interno e externo de aproximadamente 215 Å e 310 Å, respectivamente. Cada subunidade de GSDMD no poro possui duas regiões semelhantes a grampos de cabelo ("dedos") β inseridos e um domínio globular (**Fig. 2**) (XIA, *et al*, 2021).

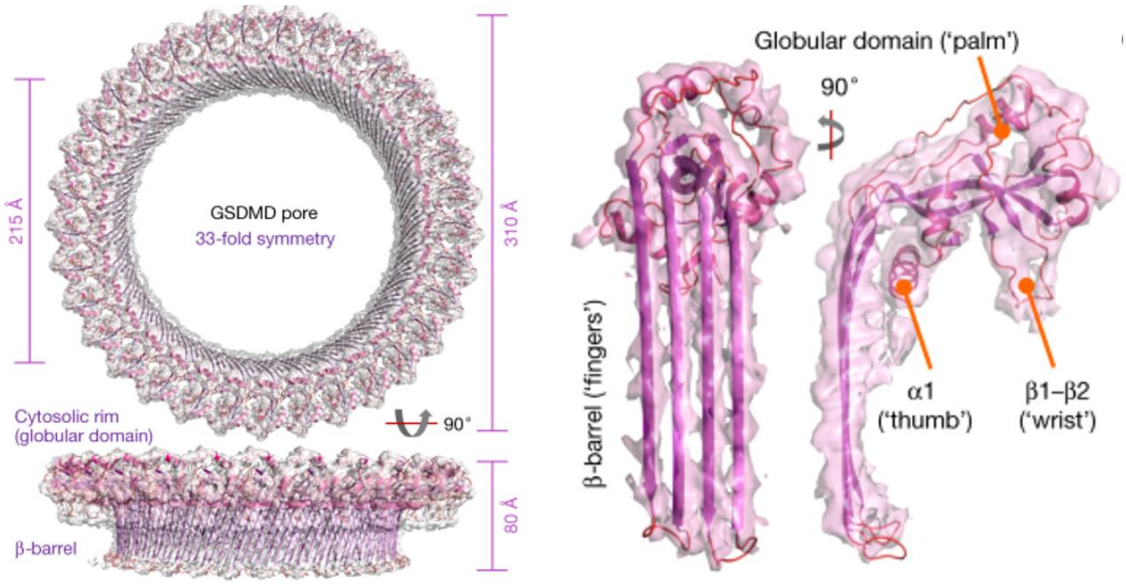


**Figura 2. Estrutura do poro de GSDMD.** Imagem da direita representando o diagrama da estrutura do poro de GSDMD composto por 33 subunidades, sendo a parte superior da figura uma ilustração de vista frontal do poro e a parte inferior uma vista lateral. Já a figura da direita representa o diagrama de uma subunidade de GSDMD. A estrutura se assemelha a uma mão esquerda humana, onde o domínio globular corresponde a palma da mão, a hélice α1 corresponde ao polegar os domínios em formato de grampo representando os dedos e a alça β1-β2 como o punho (XIA, et al, *Nature*, 2021).

A lise celular mediada pelos poros de GSDMD, além de ser uma importante função efetora da resposta imune inata, uma vez que destroi o nicho replicativo do patógeno intracelular e o expõe ao ataque por outras células e moléculas do sistema imune, ela é importante para a liberação de IL-1β, mesmo não estando envolvida na sua maturação. Esta citocina é deficiente de peptídeos sinal, que seriam responsáveis por carreá-la a membrana para secreção. A GSDMD é crucial na secreção desta citocina, sendo que a forma ativa da IL-1β parece ter sua passagem favorecida em detrimento da pró-IL-1β (XIA, *et al*, 2021). Além disso, todo o conteúdo citoplasmático de celulas piroptóticas é extravasado para o meio extracelular, tornando aquele sítio repleto de DAMPs, o que proporciona mais inflamação. A IL-1β é crítica neste processo devido, principalmente, a sua ação de alarmina que proporciona o recrutamento massivo de células imunes para eliminação do patógeno agora exposto (DINARELLO, 2009).

Recentemente um novo importante efetor de morte celular piroptótica foi desvendado. Foi demonstrado que macrófagos derivados de medula óssea deficientes em GSDMD retém parcialmente sua capacidade de entrar em piroptose após a infecção por *L. pneumophila*, este fenômeno é devido a uma via alternativa identificada *downstream* a ativação de NLRC4. Neste caso ocorre clivagem e ativação de caspase-7 por caspase-1 ou caspase-8, a ativação desta protease é uma passo importante para a formação de poros na membrana de célula deficientes em GSDMD por um mecanismo ainda não conhecido. A piroptose promovida por GSDMD ou por caspase-7 são ambas capases de levar a eliminação do nicho replicativo da *L. pneumophila* (**Fig. 3**) (GONÇALVES, *et al*, 2019).

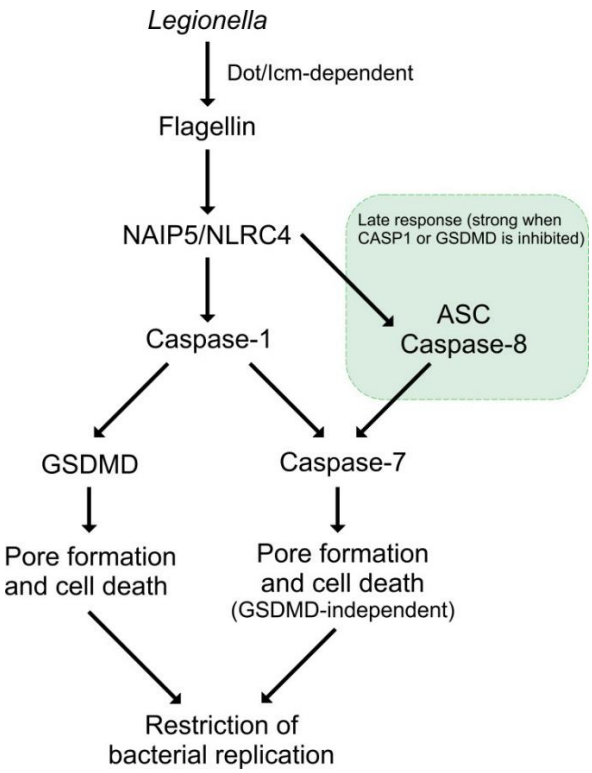


**Figura 3. Vias de morte celular dependentes de NLRC4:** Representação esquemática evidenciando que GSDMD e Caspase-7 são os principais substratos de Caspase-1 e Caspase-8 *downstream* a ativação de NAIP5/NLRC4 (GONÇALVES, et al, *PLoS pathongens*, 2019).

Já se é conhecida a capacidade da *L. pneumophila* em induzir ativação do inflamassoma de NLRC4 via flagelina e via componentes do sistema Dot/Icm, no entanto essa é extremamente mais imunogênica que estes, deste modo a *L. pneumophila* deficiente em flagelina (*ΔFlaA*) consegue evadir a morte celular dependente de NLRC4 e aumentar sua replicação. É importante ressaltar que animais selvagens infectados com *L. pneumophila ΔFlaA* e animais NLRC4 deficientes infectados com a *L. pneumophila* selvagem são igualmente susceptíveis a infecção (GONÇALVES, *et al*, 2019). No entanto, na ausência desta via, outros elementos da resposta imune ainda atuam e conseguem, mesmo com mais dificuldade, eliminar o patógeno (MASSIS, *et al*, 2016), como por exemplo, o recrutamento de células derivadas de monócito para o pulmão de animais infectados. Estas células agem ativando linfócitos da imunidade inata e células

$CD8^+$ induzindo-as a produzir IFNγ, citocina importante para o aumento do poder microbicida destas células. O mecanismo final usado elas MCs para eliminação da *L. pneumophila* ainda não foi desvendado (BROWN, *et al*, 2016; CASSON, *et al*, 2017).

Já se tem bastante conhecimento acerca dos elementos da imunidade inata responsáveis pela eliminação da *L. pneumophila*. Em contra partida, pouco se sabe sobre a resposta imune a uma outra bactéria da mesma família, a *Legionella longbeachae* e, muito do que se "conhece" sobre a resposta imune a esta bactéria acaba sendo proveniente de estudos realizados com *L. pneumophila*.

A *L. longbeachae* foi descrita em 1981. Seu isolamento foi feito a partir de biópsias de quatro pacientes, apresentando sintomas de pneumonia, que foram hospitalizados na Califórnia – EUA. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa e intracelular facultativa predominantemente encontrada no solo e em materiais vegetais em decomposição, o que está de acordo com a presença em seu genoma de alguns genes associados ao metabolismo de celulose, petcina e hemicelulose. No entanto, seu hospedeiro natural ainda não foi identificado (CAZALET, et al, 2010). Esta bactéria tem alta relevância clínica, principalmente em países do sudeste asiático e da Oceania, onde ela é responsável por mais de 50% dos casos de Legioneloses relatados (WHILEY & RICHARD, 2011; CHAMBERS, *et al*, 2021).

Acredita-se que a *L. longbeachae* naturalmente evada a ativação do inflamassoma NAIP5/NLRC4, devido a sua deficiência natural de flagelina. No entanto, com base nos conceitos discutidos acima, é possível inferir que outros inflamassomas podem atuar no reconhecimento e morte da bactéria, via reconhecimento de outros PAMPs, ou DAMPs gerados pela presença do patógeno.

Três principais estudos foram realizados na última década visando alcançar avanços no conhecimento a cerca da biologia da resposta imune inata a *L. pneumophila*. O primeiro avaliou a atividade de caspases inflamatórias no controle da infecção a esta bactérias, no entanto ficou evidenciado que caspase-1 e caspase-11 são dispensáveis neste modelo de infecção, uma vez que animais duplo-deficientes para estas caspases são similares em sobrevida e carga bacteriana aos camundongos selvagens (PEREIRA, *et al*, 2011). O segundo trabalho evidenciou um papel importante de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF e IFNγ no controle da infecção (MASSIS, et al, 2017). Enquanto o terceiro apontou em modelo murino de doença dos Legionários que as Células Linfoides associadas a Mucosas (células MAIT) são grandes fontes de IFNγ e que esta citocina é extremamente importante para o controle da replicação bacteriana *in vivo* e para a maior sobrevida dos camundongos infectados (WANG, et, al, 2018). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares a jusante do engajamento do receptor de IFNγ no contexto da doença dos Legionários ainda não estão claros. Sabe-se que os fagócitos têm elevada expressão desses receptores e que seu engajamento leva a indução da expressão de vários genes associados ao aprimoramento no potencial de microbicida, como IDO1 ou IDO2, NOXA1, NOXA2, NOS e entre outros (MICKING, 2012).

Existem pelo menos 3 isoformas descritas desta enzima: a NOS neural (NOS1), a NOS endotelial (NOS3) e a NOS induzida (NOS2). Esta última é responsável por produção massiva de Óxido Nítrico (NO), uma pequena molécula, sintetizada por vários tipos celulares, envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo circulação, pressão arterial, neurotransmissão e resposta imunológica a patógenos (MAO, *et al*, 2013).

O NO é uma importante molécula antimicrobiana produzida por uma grande diversidade de células imunes e não imunes frente ao estímulo por IFNγ, já foi mostrado

que o NO é extremamente relevante no controle de infecções por diferentes patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania spp*. (MACMICKING, 2012). Neste sentido o NO se mostra um bom candidato a molécula efetora produzida a jusante da ativação do receptor de IFNγ com relevância no controle a *L. longbeachae*.

## 2. HIPOTESES

- Já se sabe que IFNγ é crítico para a imunidade contra *L. longbeachae*. Esta citocina é conhecida por induzir fortemente a expressão de NOS2 em fagócitos para aumentar seu poder microbicida. Neste sentido hipotetizamos que o NO é a molécula efetora produzida *downstream* ao IFNγ responsável pelo *killing* bacteriano.

- Também sabemos que as caspases-1 e 11 são dispensáveis na reposta a *L. longbeachae*, no entanto já foi mostrado para outra bactéria do mesmo gênero (*L. pneumophila*) que na ausência destas caspases existe uma via alternativa, d*ownstream* a ativação de NAIP5/NLRC4, que atua para induzir morte celular e promover a eliminação do nicho replicativo do patógeno. Estes pressupostos nos levaram nos levaram a formular a hipótese que os inflamassomas têm função protetora na infecção por *L. longbeachae* e que estas plataformas conseguem induzir morte celular, mesmo na ausência de Caspases-1 e 11.

# 3. OBJETIVOS:

## 3.1. Objetivo geral

Investigar a interação entre morte celular e óxido nítrico na restrição a *L. longbeachae*.

## 3.2. Objetivos específicos:

Investigar o perfil de recrutamento celular para pulmão de animais infectados com *L. longbeachae*, bem como a expressão de NOS2 nestas células;

Avaliar a importância da NOS2 no controle da replicação bacteriana, bem como na sobrevida e perda de peso de animais infectados com *L. longbeachae*;

Acessar o impacto do NO na produção de citocinas pró-inflamatórias e de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs);

Avaliar a carga bacteriana e a sobrevida de animais *Asc/Casp1/Casp11*$^{-/-}$, *Casp1/Casp11*$^{-/-}$, *Aim2/Casp1/Casp11*$^{-/-}$, *Nlrp3*$^{-/-}$, *Aim2*$^{-/-}$ e *Gsdmd*$^{-/-}$ infectados com *L. longbeachae*;

Investigar a clivagem de moléculas alvo de inflamassomas ativos, como GSDMD em resposta a *L. longbeachae;*

Avaliar o papel da GSDMD no recrutamento de células imune e na expressão de NOS2 por elas.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1. Animais

Camundongos utilizados neste estudo foram cruzados e mantidos nos biotérios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP ou da Universidade da Califórnia, Berkeley, e sua manipulação seguiu as diretrizes de utilização de animais em pesquisa aprovadas pela CETEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, número de protocolo 218/2014), que segue as normas recomendadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal). Experimentos conduzidos na UC Berkeley foram aprovados pelo comitê institucional de cuidado e uso de animais da universidade. Camundongos foram eutanasiados por asfixia por CO2 seguido por deslocamento cervical.

Foram utilizadas as seguintes linhagens: C57BL/6 (Jax 000664), *Casp1/11*$^{-/-}$ (LI et al, 1995), *Asc*$^{-/-}$ (SUTTERWALA et al, 2006), *Asc/Casp1/11*$^{-/-}$ (MASCARENHAS et al, 2017), *Gsdmd*$^{-/-}$ (RAUCH et al, 2017), *Aim2*$^{-/-}$, *Nos2*$^{-/-}$ e *Nlrp3*$^{-/-}$(MARIATHASAN, SANJEEV ET AL, 2006).

## 4.2. Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

Camundongos foram eutanasiados e células da medula óssea foram extraídas de fêmures e tíbias. As células foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachussetts, EUA) suplementado com 10-20% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 7 dias, a 37°C e 5% de CO2. Para macrófagos, foi adicionado 10% de meio condicionado de células S3T3 expressando estavelmente M-CSF de camundongo. As células foram removidas da placa usando solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco) gelada com 5 mM de EDTA, ressuspendidas em RPMI 1640 suplementado com SFB a 10% (R10) e plaqueadas como indicado. Para todos os experimentos *in vitro*, as placas foram centrifugadas a 300 g por

5 min a temperatura ambiente após plaqueamento e infecção para garantir aderência homogênea das células e sincronização das infecções, respectivamente. A incubação de células infectadas e não infectadas foi feita a 37°C e 5% de CO2.

### 4.3. Cultura e preparo de bactérias

Bactérias (DZ 420, *L. longbeachae* NSW 150 resistente a estreptomicina) foram cultivadas em ágar-carvão com extrato de levedura (CYE, 10 g/L de ácido 4-morfolinopropanosulfônico [MOPS] ou ácido N-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfônico [ACES], 10 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de ágar técnico, 2 g/L de carvão ativado, suplementado com 0,4 g/L de L-cisteína e 0,135 g/L de Fe(NO3)3) a 35-37°C por 4 dias a partir de estoques congelados. Colônias isoladas foram estriadas em placas novas e incubadas por mais 2 dias. Para infecções *in vitro*, bactérias cultivadas em placas sólidas foram ressuspendidas em água destilada e diluídas em RPMI como indicado. Para infecções *in vivo*, bactérias cultivadas em placas sólidas foram ressuspendidas em água destilada autoclavada diluídas em PBS.

### 4.4. Quantificação de NETs

Resumidamente, o BAL foi incubado durante a noite em uma placa pré-revestida com anticorpo anti-MPO (Thermo Fisher Scientific; cat. PA5-16672). O DNA ligado a MPO foi quantificado usando o kit Quant-iT PicoGreen (Invitrogen; cat. P11496), conforme descrito (COLÓN, et al., 2019; CZAIKOSKI, et al., 2016).

### 4.5. Western Blotting

Para medir a clivagem de GSDMD por Western blot, $10^6$ células foram plaqueadas em R10 em placas de 48 poços e incubadas overnight. As células foram primadas com LPS ultrapuro (500 ng/ml) por 4 h, em seguida o meio contendo LPS foi substituído por uma suspensão bacteriana em R10 com MOI 10 e a placa foi 4 horas. Os sobrenadantes

foram coletados GSDMD e células foram lisadas com 50 µL de RIPA suplementado com inibidor de proteases (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Switzerland). Os lisados foram adicionados aos sobrenadantes. As amostras foram imediatamente sonicadas por 10 min e armazenadas a -80°C até a análise. 50 µg de proteína de cada amostra foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida a 15% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em solução salina tamponada com Tris-base suplementada com Tween a 0,01% (TBS-Tween) por 1 h e incubadas overnight a 4°C sob agitação leve com o anticorpo monoclonal de rato para GSDMD (GN20-13, Genentech) diluído 1:1000 em leite em pó desnatado a 5% em TBS-Tween. As membranas foram lavadas 3x de 5 min sob agitação média com TBS-tween e incubadas com anticorpo secundário anti-rato (Sigma-Aldrich. Missouri, EUA) na diluição de 1:3000 por 1 h a temperatura ambiente em leite em pó desnatado a 5% em TBS-Tween. As membranas foram lavadas 3x de 5 min sob agitação média com TBS-tween e analisadas usando ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare, Illinois, EUA) e um fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

### 4.6. Ensaios de replicação *in vivo*

Todos os camundongos foram pareados por idade e sexo e todos tinham pelo menos 8 semanas de idade no momento da infecção. Os nocautes utilizados são baseados na linhagem C57BL/6. Para os experimentos *in vivo*, foram usados 3-6 camundongos por grupo, como indicado nas figuras. Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e infectados por via intranasal com $10^5$ bactérias em 40 µL de água autoclavada. Nos tempos indicados, os pulmões foram coletados e macerados por 30 s em 5 mL de água destilada autoclavada usando um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125; Thermo Scientific). Diluições

foram plaqueadas em CYE suplementado com 10 µg/mL de estreptomicina e as placas foram incubadas por 4 dias a 35°C para contagem de Unidades formadoras de colônias (CFU).

### 4.7. Quantificação de proteinas no lavado broncoalveolar

Animais infectados foram eutanasiados por excesso de anestésicos e a traqueia foi exposta utilizando material cirúrgico. A traqueia foi canulada utilizando cateter Angiocath 18GA 1,88" e 1 mL de PBS foi injetado e recuperado 3 vezes. O lavado foi coletado em um microtubo e proteínas totais foram quantificadas utilizando ensaio de Bradford.

### 4.8. Ensaio de mortalidade

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens pareados por idade e sexo, todos com pelo menos 8 semanas de idade no momento da infecção com n de 7 – 11 camundongos por grupo. Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e infectados por via intranasal com $10^6$ bactérias em 40 µL de água autoclavada. O peso e temperatura dos animais e a mortalidade foi acompanhada por 10 dias.

### 4.9. Citometria de fluxo

**Tabela 1 –** Painel de anticorpos para marcadores mieloides utilizados na citometria de fluxo.

| Célula | Marcadores | Live/Dead |
|---|---|---|
| Neutrófilos | CD45+, CD11b+Ly6G+, Ly6C- e NOS2+ | Negativo |
| Monócitos | CD45+, Ly6G-, Ly6C+, CD11b+, MHC-II+ e iNOS+ | Negativo |

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e infectados por via intranasal com $10^6$ bactérias em 40 µL de água autoclavada. Os pulmões foram coletados e tratados com colagenase a 1 mg/mL e DNAse I a 0,1 mg/mL em RPMI por 1 h e a reação foi interrompida com SFB. O tecido foi macerado em peneira de 70 µM e a suspensão de células foi lavada e tratada com solução de lise de hemácias. Para a marcação, a suspensão de células foi bloqueada por 20 min com soro de cabra a 5% e Fc Block (BioLegend, Califórnia, EUA) diluído 1:1000 em RPMI. As células foram lavadas com PBS e incubadas por 30 min com as soluções de anticorpos para marcadores de células mieloides descritos na Tabela 1. Para coloração intracelular, as células foram primeiro fixadas com IC Fixation Buffer (eBioscience 00-8222-49) por 30 min em gelo e o anticorpo foi diluído em Tampão de Permeabilização 1× (eBioscience 00-8333-56). As células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS, lavadas novamente e submetidas a citometria de fluxo. Monócitos foram definidos como células $CD45^+$, $Ly6G^-$, $CD11b^+$ e $Ly6C^+$. Enquanto os neutrófilos foram identificados como células $CD45^+$, $Ly6G^+$ e $CD11b^+$. As aquisições foram performadas utilizando o equipamento FACSCantoII (BD Biosciences, Califórnia – USA). As análises foram realizadas no *software FlowJo* (TreeStar – USA), considerando somente *singleds* e células vivas (**Fig 4**).

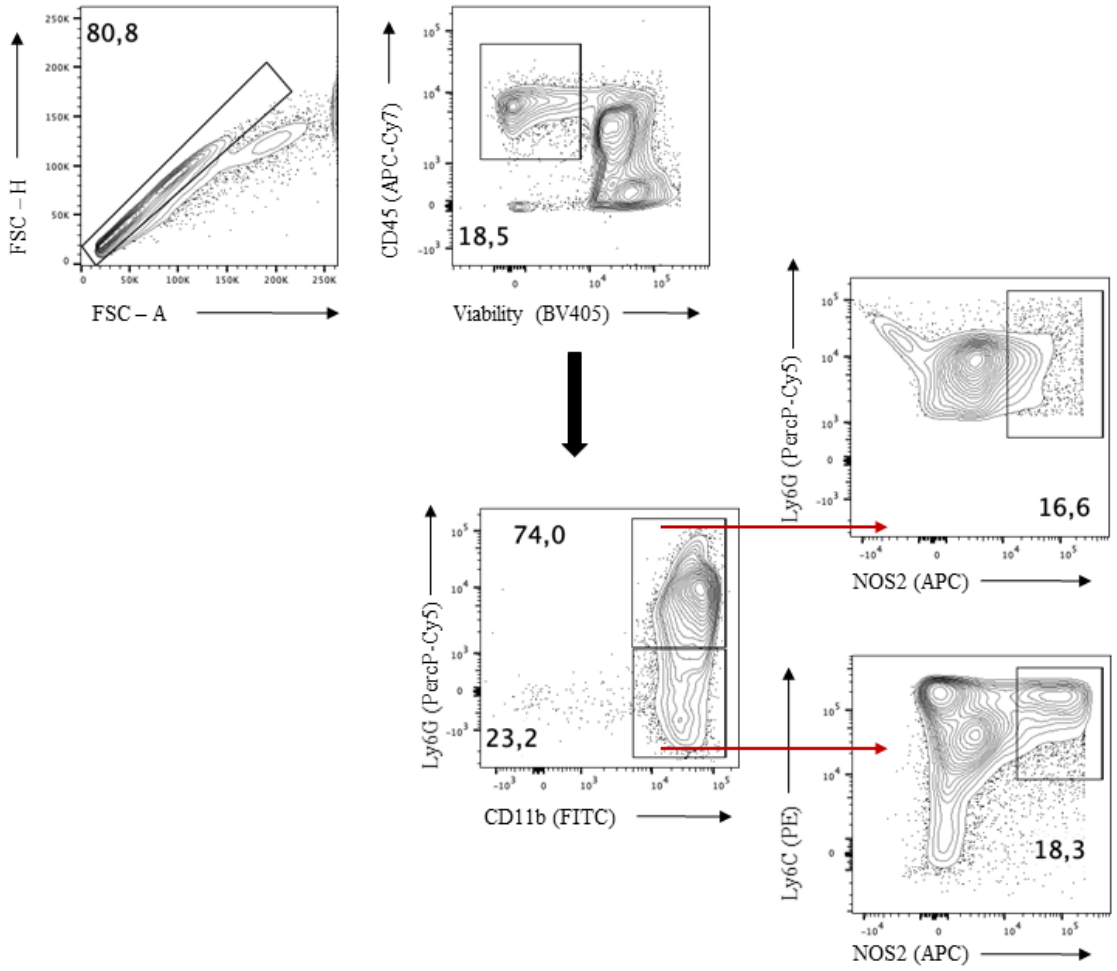


**Figura 4. Estratégia de *gate* de citometria**. Primeiramente foram excluídos *debris* celulares e *dublets* (*gate* 1), em seguida foram selecionados os eventos vivos CD45+ (gate 2). Células $CD11b^{+}/Ly6G^{+}$ (neutrófilos) foram selecionados no *gate* superior do dotplot 3, enquanto células $CD11b^{+}/Ly6G^{-}$ (monócitos) foram agrupados no gate inferior do dotplot 3. No 5° *gate* selecionamos neutrófilos positivos para NOS2, enquanto o gate 6 reuniu monócitos $NOS2^{+}$.

# 5. RESULTADOS

## 5.1. O Óxido Nítrico é produzido em altos níveis por células mielóides e é detrimental na infecção por *L. longbeachae*.

Já foi demonstrado por outros grupos o papel protetor do IFNγ em resposta a diferentes bactérias do gênero *Legionella*, no entanto, em todos os casos, os mecanismos *downstream* ao engajamento do receptor de IFNγ permanecem desconhecidos (BROWN, *et al*, 2016; WANG, et, al, 2018). Tendo em vista que fagócitos tem alta expressão destes receptores e que seu engajamento leva ao aumento na expressão de NOS2 (MICKING, 2012), decidimos avaliar a expressão desta enzima, que é responsável pela síntese induzida de NO, em neutrófilos e monócitos isolados de pulmões de animais C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* ou *L. pneumophila*, três dias após a infecção (**Fig. 5**).

Não encontramos diferença significativa na expressão de NOS2 por neutrófilos e monócitos oriundos de pulmões de animais infectados com *L. pneumophila* em comparação com animais não infectados. No entanto, animais infectados com *L. longbeachae* apresentaram um alto infiltrado de monócitos e neutrófilos expressando altos níveis de NOS2 (**Fig. 5 a-c**).

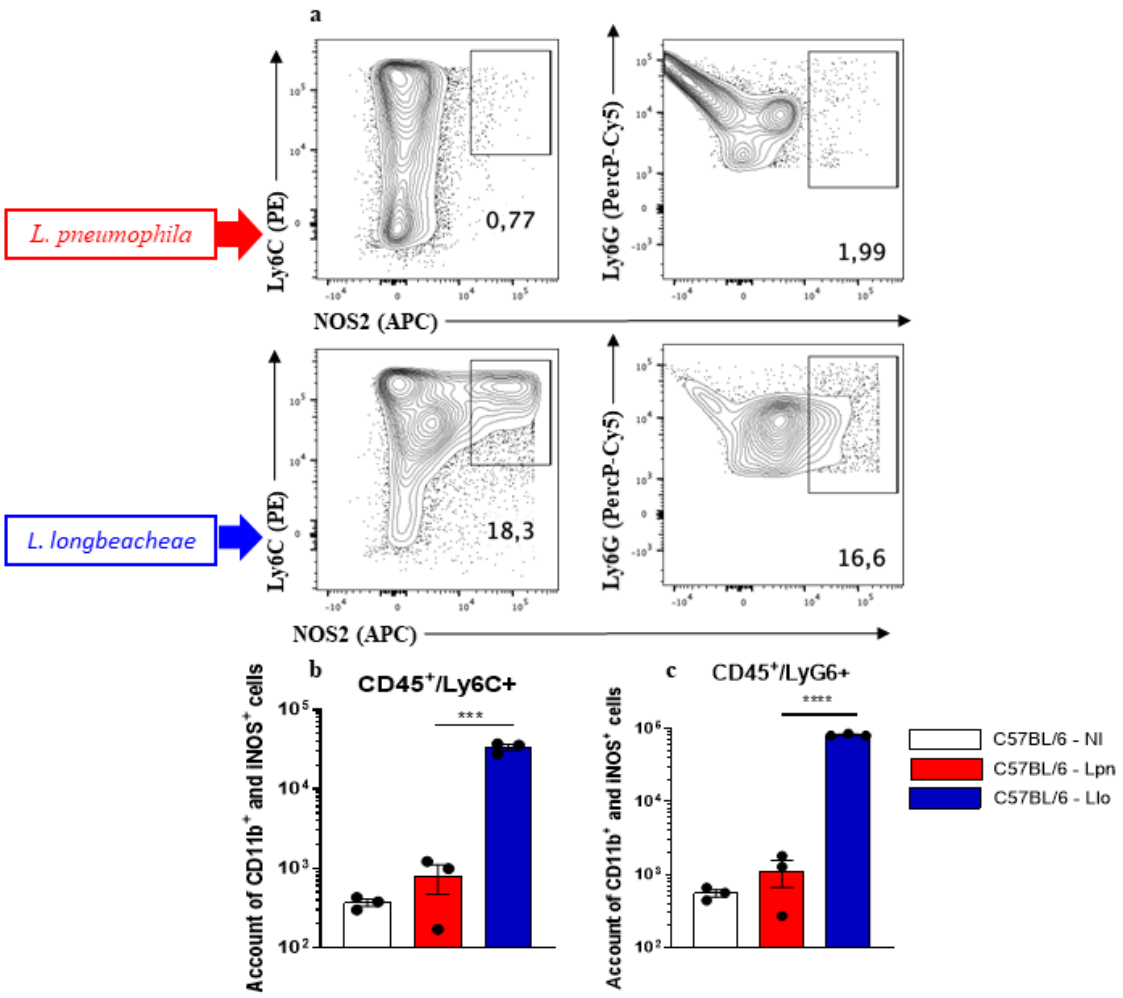


**Figura 5. Monócitos e neutrófilos expressão elevados níveis de NOS2 em resposta a infecção por *L. longbeachae*. (a)** Dotblots representativos de células mieloides NOS2$^{+}$. Frequência relativa de monócitos **(b)** e neutrófilos **(c)** NOS2$^{+}$ oriundos de pulmões de camundongos C57BL/6 após três dias de infecção com 1X10$^{6}$ CFU de *L pneumophila* e *L. longbeachae*. **(b)**. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados independentemente com 3 animais por grupo, e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* Student não pareado, e P < 0,05 (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Tendo conhecimento da elevada expressão de NOS2 em células mielóides do pulmão de animais infectados com L. *longbeachae*, hipotetizamos que o NO estaria sendo utilizado por estas células para combater a bactéria. Então, infectamos animais C57BL/6 e animais *Nos2*$^{-/-}$ e comparamos a perda de peso, sobrevida e carga bacteriana em ambos (**Fig 6 a-c**). Surpreendentemente descobrimos que os animais deficientes para a síntese induzida

de NO eram mais resistente a infecção quando comparados aos animais selvagens. Animais *Nos2*$^{-/-}$ tiveram menor perda de peso, aproximadamente 50% a mais de sobrevida do que camundongos selvagens, bem como uma carga bacteriana extremamente reduzida no pulmão (aproximadamente 3 logs a menos), após três dias de infecção (**Fig. 6**).

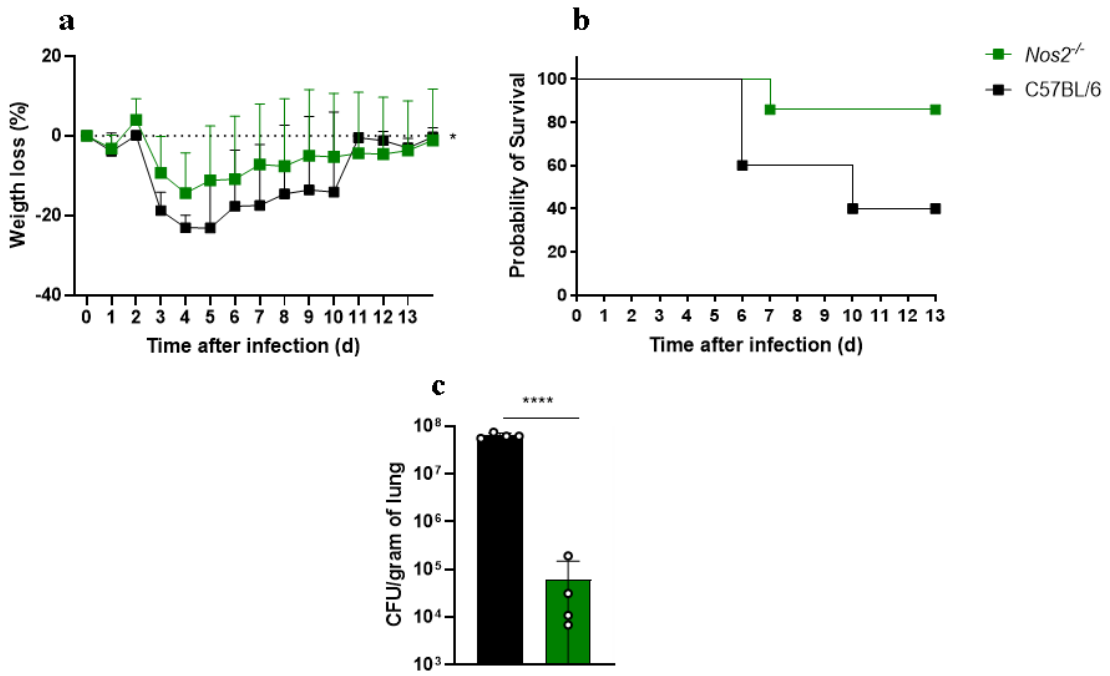


**Figura 6. Animais *NOS2*$^{-/-}$ tem maior proteção contra a infecção por *L. longbeachae* quando coparados a animais selvagens.** Cinco animais C57BL/6 e 7 NOS2-/- foram infectados com 1X10$^{6}$ CFU de *L. longbeachae* e a perda de peso **(a)** e a sobrevida **(b)** foram avaliadas ao longo de 13 dias. **(c)** Animais com estes mesmo genótipos, sendo 4 animais por grupo, foram infectados com 1X10$^{5}$ CFU de *L. longbeachae*, após 3 dias de infecção os animais foram sacrificados e a carga bacteriana do pulmão destes camundongos foi acessada. Os resultados são representativos de três experimentos realizados independentemente para **(a)** e **(b)** e de um experimento para **(c),** e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste de classificação logarítmica de Mantel-Cox para **(a)** e **(b)** e *t* Student não pareado para **(c)**. Valores de $P < 0,05$ (*) foram considerados estatisticamente significativos.

O NO é extremamente conhecido como uma molécula antimicrobiana (MICKING, 2012), no entanto nossos dados apontam que sua produção está associada ao aumento da replicação bacteriana. Então nos questionamos, como isto de fato ocorre? Postat e colaboradores (2018), estudando a regulação da resposta imune a *Leishmania major*, descobriram que o NO tem um papel crucial no desligamento da resposta imune após a eliminação do patógeno, segundo os autores a presença do NO atua inibindo a respiração celular e reduzindo sua razão ATP:ADP, fenômeno que leva a uma diminuição na secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.

A partir destes pressupostos, hipotetizamos que a *L. longbeachae* poderia estar promovendo o desligamento da resposta imune via indução massiva da produção de NO. Assim o pulmão se tornaria um ambiente menos inflamado e portanto mais benéfico para a replicação bacteriana. Para testar esta hipótese, infectamos camundongos *Nos2*$^{-/-}$ e C57BL/6 com *L. longbeachae* e 5 dias após a infecção, acessamos a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias no homogenato do pulmão, soro e lavado broncoalveolar dos animais (**Fig. 7**).

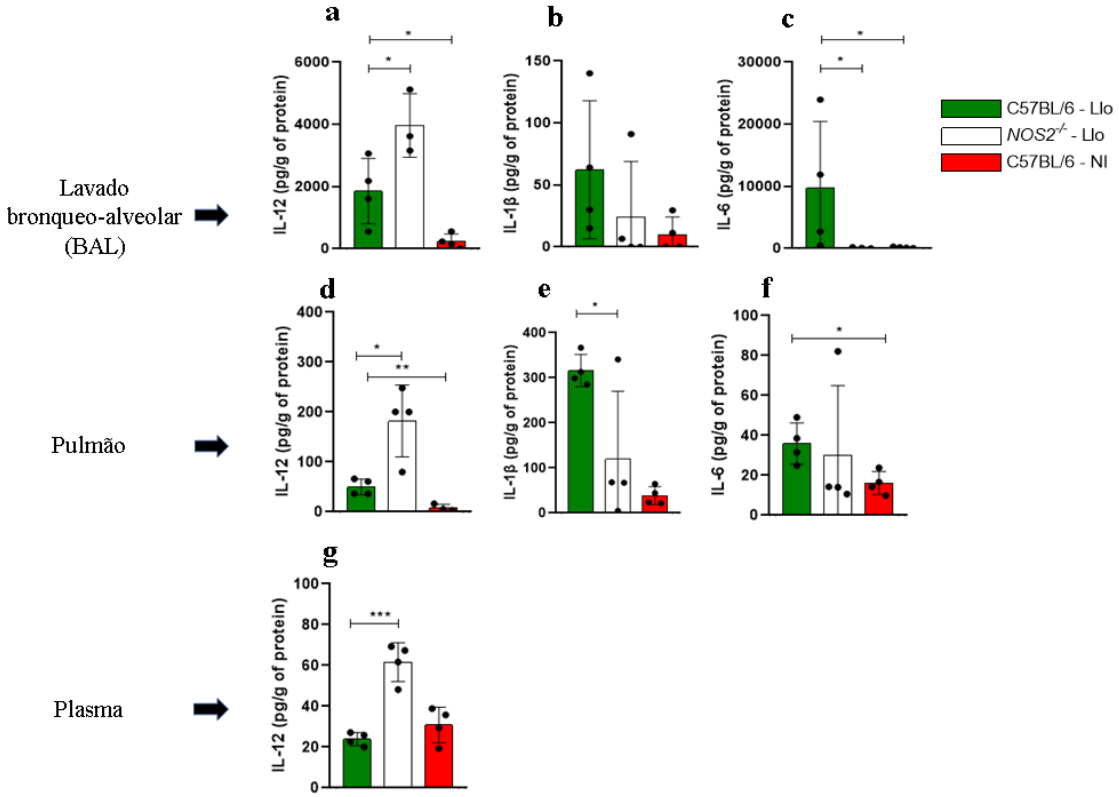


**Figura 7. Animais deficientes para a produção de NO têm forte resposta de IL-12 em resposta a *L. longbeachae* e baixa produção de IL-6 e IL-1β.** A concentração de IL-12 foi mensurada no BAL, no pulmão e no plasma de animais infectados com $1X10^6$ CFU de *L. longbeachae* **(a)**, **(d)** e **(g)** após 5 dias de infecção. Também foram avaliadas as concentrações de 1L-1β **(b)** e **(e)**, e IL-6 (c) e (f). As duas últimas foram acessadas apenas no BAL e no pulmão. Os resultados são representativos de um experimento realizado com 3 animais por grupo, e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student não pareado, e $P < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Encontramos uma elevada produção de IL-1β e IL-6 em animais C57BL/6 quando comparados aos animais *Nos2*$^{-/-}$. Estes animais deficientes de NOS2 além de ter baixos níveis destas citocinas de infecção aguda, apresentaram altos níveis de IL-12 em todos os compartimentos avaliados (**Fig. 7 a – g**). Indicando que esta citocina, ao contrário da IL-1β e IL-6, pode ter um papel protetor na infecção por *L. longbeachae*.

Adicionalmente hipotetizamos que o NO poderia estar modulando a produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) de modo a causar comprometimento do pulmão infectado. Então avaliamos também a produção de NETs no BAL destes animais

e encontramos uma tendência para redução de NETs no BAL de animais *Nos2*$^{-/-}$, no entanto não encontramos uma diferença significativa (**Fig. 8**).

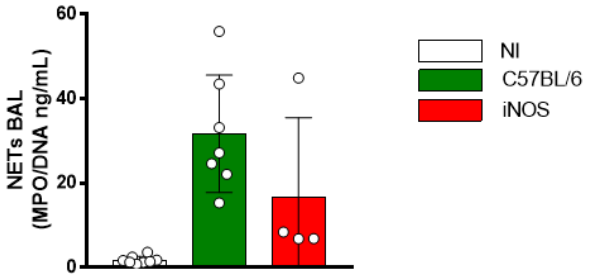


**Figura 8. Animais deficientes para produção de NO apresentam leve redução na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) em resposta a *L. longbeachae*.** Animais selvagens (N = 7) e NOS2-/- (N = 4) foram testados quanto a sua concentração de NETs no BAL em resposta a infecção com 1X10$^6$ CFU de *L. longbeachae* (animais não infectados: N = 9) após cinco dias de infecção. Os resultados são representativos de um experimento realizado e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student não pareado, e P < 0,05 (*) foi considerado estatisticamente significativo.

### *5.2.* A GSDMD é o efetor de morte celular piroptótica chave no controle da infecção por *L. longbeachae*.

Nossos dados evidenciam uma possível associação entre ausência de morte celular piroptótica e aumento de expressão de NOS2. É notório que animais infectados com *L. pneumophila*, uma bactéria com alta capacidade de ativação de piroptose via NAIP5/NLRC4, tem um baixo infiltrado de células mielóides expressando NOS2. Já animais infectados por *L. longbeachae*, bactéria mais silenciosa que evade a morte celular dependente de NAIP5/NLRC4 devido a sua deficiência natural de flagelina, apresentam grandes quantidades de neutrófilos e monócitos positivos para NOS2. A partir desta observação, questionamos se a morte celular piroptótica regularia a produção de NO para combater a infecção.

Para entender o impacto da morte celular na regulação da produção de NO, decidimos remover mais componentes importantes neste processo. Além da ausência natural de ativação de NLRC4 pela *L. longbeachae*, utilizamos animais *Gsdmd*$^{-/-}$. Nós não encontramos diferença no infiltrado pulmonar de células CD45$^{+}$ produtoras de NO, no entendo ao avaliarmos suas sub populações separadas observamos um maior número de neutrófilos produtores de NO no pulmão de animais deficientes para *Gsdmd*$^{-/-}$, enquanto a populção de monócitos NOS2+ apresentou tendência a redução nos animais KO (**Fig. 9**). Nossos dados sugerem que a morte celular constitui um mecanismo regulatório da produção de NO em neutrófilos.

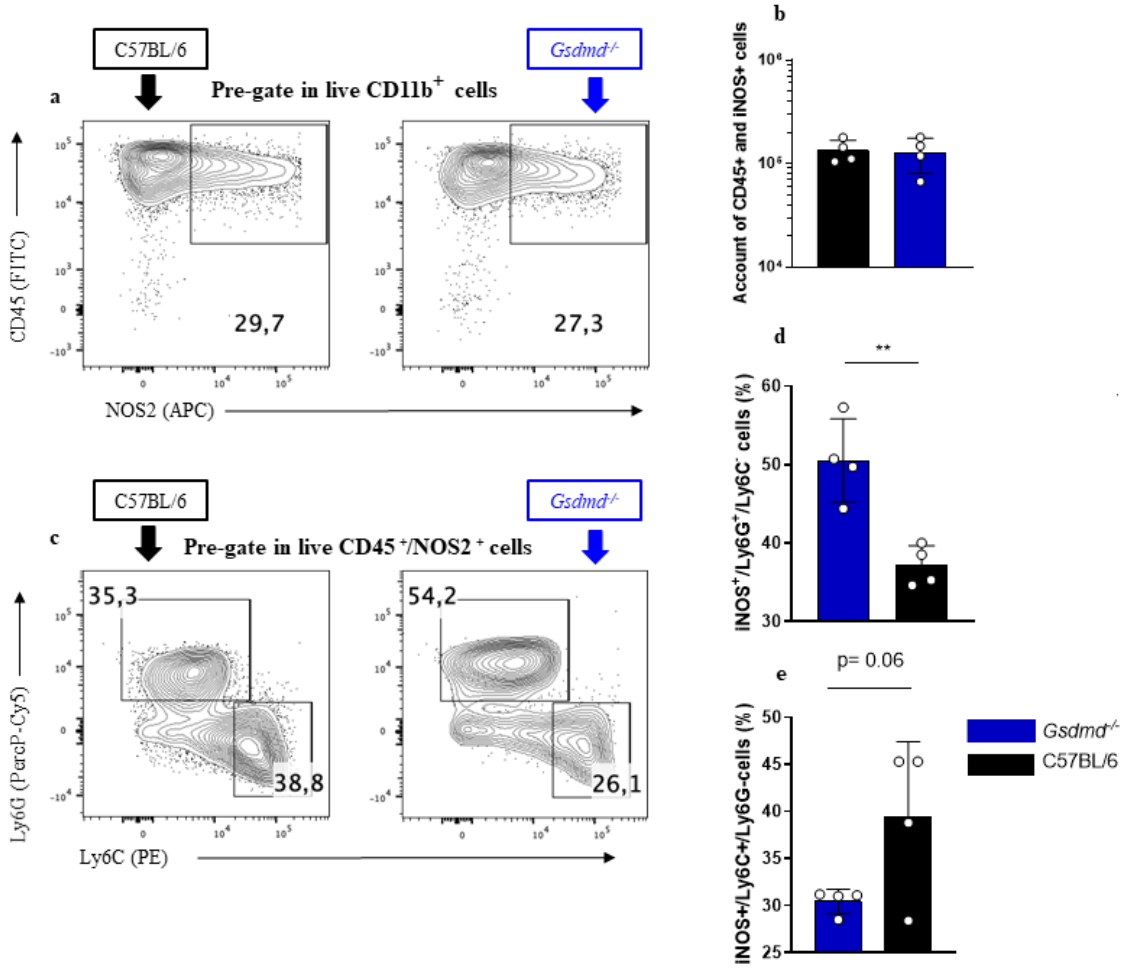


**Figura 9. Expressão de NOS2 em neutrófilos é impulsionada pela ausência de GSDMD.** Camundongos selvagens e *Gsdmd*$^{-/-}$ foram infectados com 1X10$^{6}$ CFU de *L. longbeachae* e três dias após a infecção a expressão de NOS2 por células mieloides foi acessada. **(a – b)** Dotblot representativo e gráfico de barras evidenciando a expressão de

NOS2 em células CD45+. **(c)** e **(d)** Expressão de NOS2 avaliada em neutrófilos (gate superior esquerdo); **(c)** e **(e)** expressão de NOS2 avaliada em em monócitos (gate inferior direito). Os resultados são representativos de um experimento realizado com 4 animais por grupo, e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* Student não pareado, e P < 0,05 (*) foi considerado estatisticamente significativo

A morte celular parece ter atividade regulatória da produção de NO e esta molécula é crítica na infecção por *L longbeachae*, decidimos avaliar a resposta de animais *Asc/Casp1/11*$^{-/-}$, que são deficientes para as principais vias de morte celular piroptótica que operam em resposta a esta bactéria.

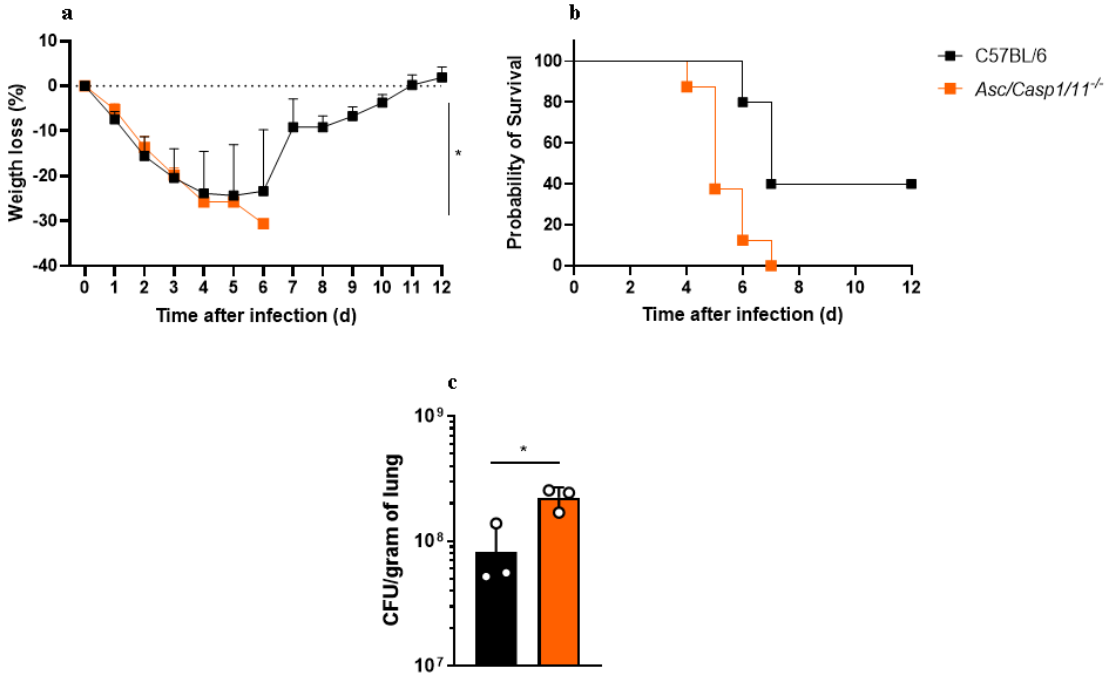


**Figura 10.Os inflamassomas e a morte celular tem função protetora na infecção por *L. longbeachae*.** Animais C57BL/6 (N = 10) e *Nos2*$^{-/-}$ (N = 8) foram infectados com 1x10$^{6}$ CFU de *L. longbeachae* e a perda de peso **(a)** e a sobrevida **(b)** foram avaliadas ao longo de 12 dias. **(c)** Animais com estes mesmo genótipos, sendo 3 animais por grupo, foram infectados com 1X10$^{5}$ CFU de *L. longbeachae*, após 3 dias de infecção os animais foram sacrificados e a carga bacteriana do pulmão destes camundongos foi acessada. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados independentemente, e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste de classificação logarítmica de Mantel-Cox para **(a)** e **(b)** e *t* de Student não pareado para **(c)**. Valores de P < 0,05 (*) foram considerados estatisticamente significativos.

Como esperado, de fato os animais *Asc/Casp1/11-/-* são extremamente susceptíveis a infecção pela *L. longbeachae*, quando comparados com animais selvagens,

apresentando uma sobrevida extremamente reduzida, bem como elevada carga bacteriana e perda de peso. Indicando que a morte celular piroptótica é crucial no controle da infecção (**Fig. 10**).

O próximo passo foi investigar se a GSDMD, o principal efetor de morte celular pirptótica, estaria envolvido na imunidade a *L. longbeachae*. Animais *Gsdmd*$^{-/-}$ e C57BL/6 foram infectados com uma dose semiletal ($10^6$) da bactéria e acompanhados ao longo de 13 dias. Compatível com os resultados alcançados nos ensaios com animais *Asc/Casp1/11*$^{-/-}$, os animais deficientes em GSDMD também são extremamente sussetíveis a infecção, eles apresentam 0% de sobrevida logo no 7° dia após a infecção, bem como maior perda de peso e maior carga bacteriana quando comparados aos animais selvagens (**Fig. 11**).

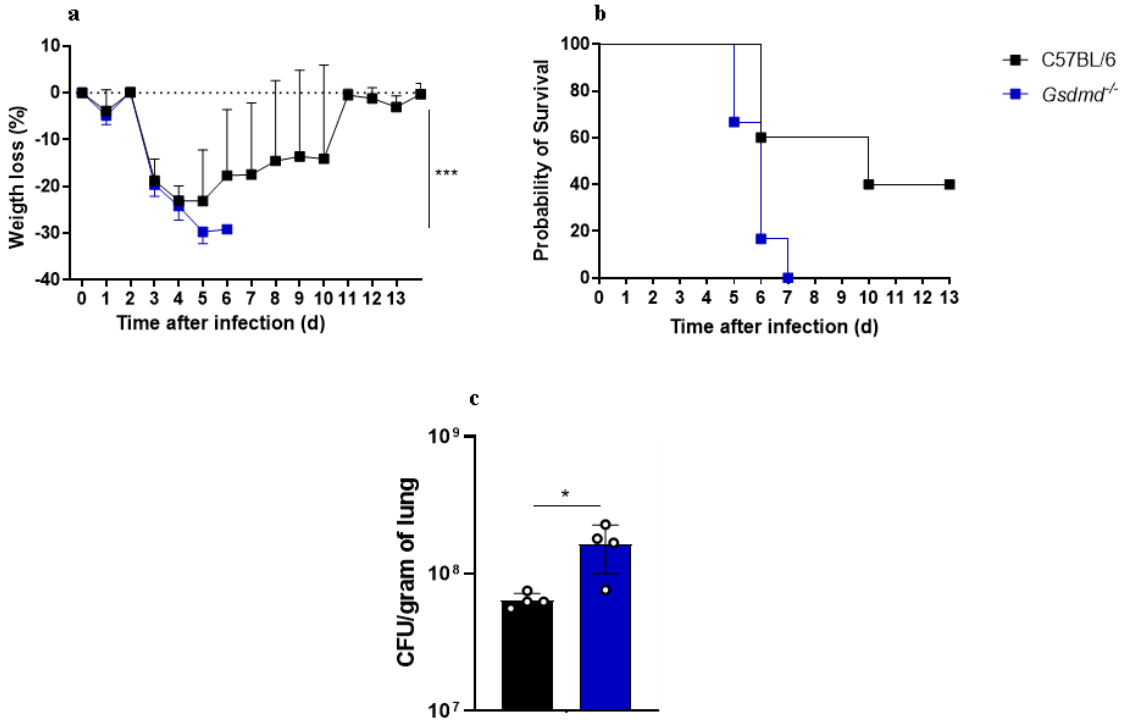


**Figura 11. A GSDMD desempenha um papel importante no controle da infecção por *L. longbeachae*.** Animais C57BL/6 (N = 5) e *Gsdmd*$^{-/-}$ (N =6) foram infectados com $1x10^6$ CFU de *L. longbeachae* e a perda de peso **(a)** e a sobrevida **(b)** foram avaliadas ao longo de 13 dias. **(c)** Animais com estes mesmo genótipos, sendo 4 animais por grupo, foram infectados com $1X10^5$ CFU de *L. longbeachae*, após 3 dias de infecção os animais foram sacrificados e a carga bacteriana do pulmão destes camundongos foi acessada. Os

resultados são representativos de três experimentos realizados independentemente para **(a)** e **(b)** e de um experimento para **(c),** e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste de classificação logarítmica de Mantel-Cox para **(a)** e **(b)** e *t* Student não pareado para **(c)**. Valores de $P < 0,05$ (*) foram considerados estatisticamente significativos.

A morte celular e os inflamassomas possuem grande relevância no controle à infecção por *L. longbeachae* e que a função efetora final deste processo é a morte celular piroptótica dependente de GSDMD. No entanto, resta descobrir qual ou quais inflamassomas estariam intermediando a detecção do patógeno e a promoção de piroptose.

O inflamassoma de AIM2 já teve seu papel protetor contra a infecção por *L. pneumophila* descrito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CUNHA, et al, 2013), então inicialmente investigamos se este inflamassoma seria relevante também na imunidade a *L. longbeachae*. Animais *Aim2*$^{-/-}$ foram infectados com $1X10^6$ CFU de *L longbeachae* e sua perda de peso (**Fig. 12 a**) e sobrevida (**Fig. 12 b**) foram avaliadas ao longo de 10 dias. Encontramos uma leve redução na perda de peso nos camundongos deficientes em AIM2, no entanto esta diferença não foi significativa e além disto, estes animais apresentaram sobrevida semelhante aos selvagens. Acessamos também a carga bacteriana no pulmão de camundongos *Aim2*$^{-/-}$ infectados com $1X10^5$ CFU de *L. longbeachae* e novamente não observamos diferença na susceptibilidade, havendo apenas um tendência para redução da carga bacteriana nos animais deficientes ( **Fig. 12 c**).

Tendo inicialmente descartado a relevância do inflamassoma de NLRC4 em resposta a bactéria, devido a sua deficiência de flagelina, decidimos investigar se o inflamassoma de NLRP3 teria relevância na resposta a *L. longbeachae*. Decidimos infectar animais *Nlrp3*$^{-/-}$ com $1X10^6$ CFU da bactéria e novamente acessar a perda de peso (**Fig. 13 a**) e a sobrevida (**Fig, 13 b**) destes camundongos durante um período de 10 dias.

Assim como observado nos animais deficientes em AIM2 não foram mais susceptíveis que os animais selvagens, levando em consideração os dois parâmetros avaliados.

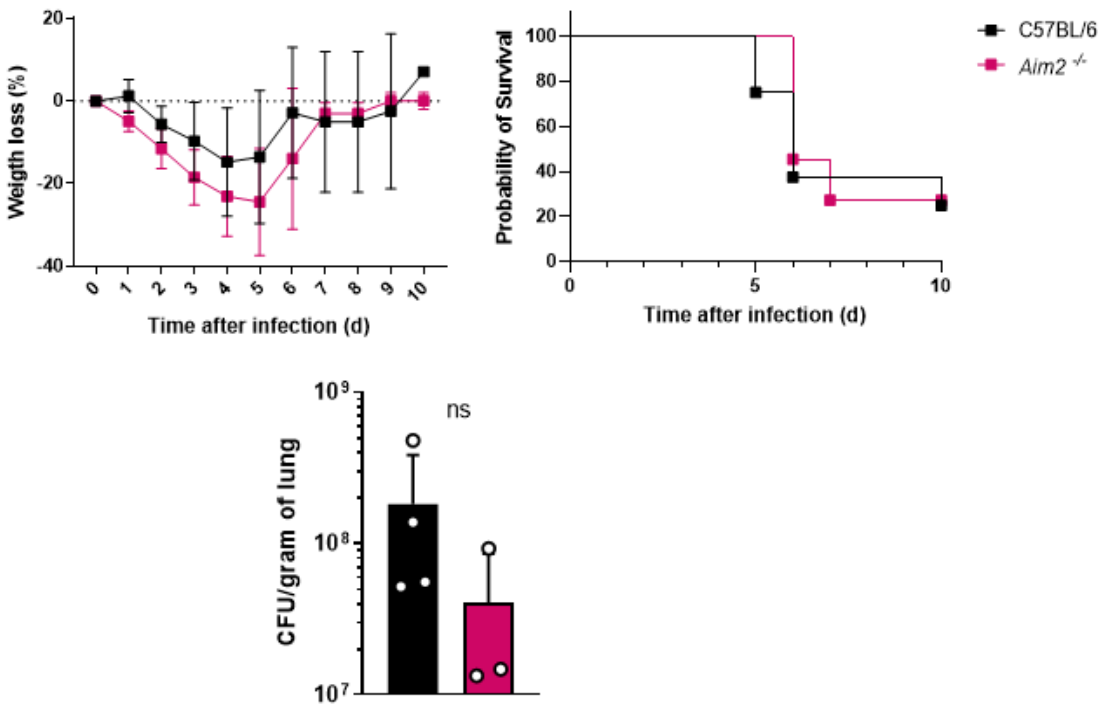


**Figura 12. O inflamassoma de AIM2 é dispensável na infecção por *L. longbeachae*.** Animais C57BL/6 (N = 10) e *Aim2*$^{-/-}$ (N =11) foram infectados com 1X10$^{6}$ CFU de *L. longbeachae* e a perda de peso **(a)** e a sobrevida **(b)** foram avaliadas ao longo de 10 dias. **(c)** Animais com estes mesmo genótipos, sendo entre 3 e 4 animais por grupo, foram infectados com 1X10$^{5}$ CFU de *L. longbeachae*, após 3 dias de infecção os animais foram sacrificados e a carga bacteriana do pulmão destes camundongos foi acessada. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados independentemente e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste de classificação logarítmica de Mantel-Cox para **(a)** e **(b)** e teste t Student não pareado para **(c)**. Valores de P < 0,05 (*) foram considerados estatisticamente significativos.

Adicionalmente avaliamos a replicação bacteriana em camundongos *Nlrp3*$^{-/-}$ infectados com 1X10$^{5}$ CFU de *L. longbeachae* e surpreendentemente encontramos uma redução na carga bacteriana no pulmão destes camundongos após três dias de infecção (**Fig. 13 c**), indicando que o inflamassoma de NLRP3 participa da resposta imune contra

a bactéria, no entanto, outro (os) inflamassoma (as) e outras abordagens experimentais precisam ser realizadas.

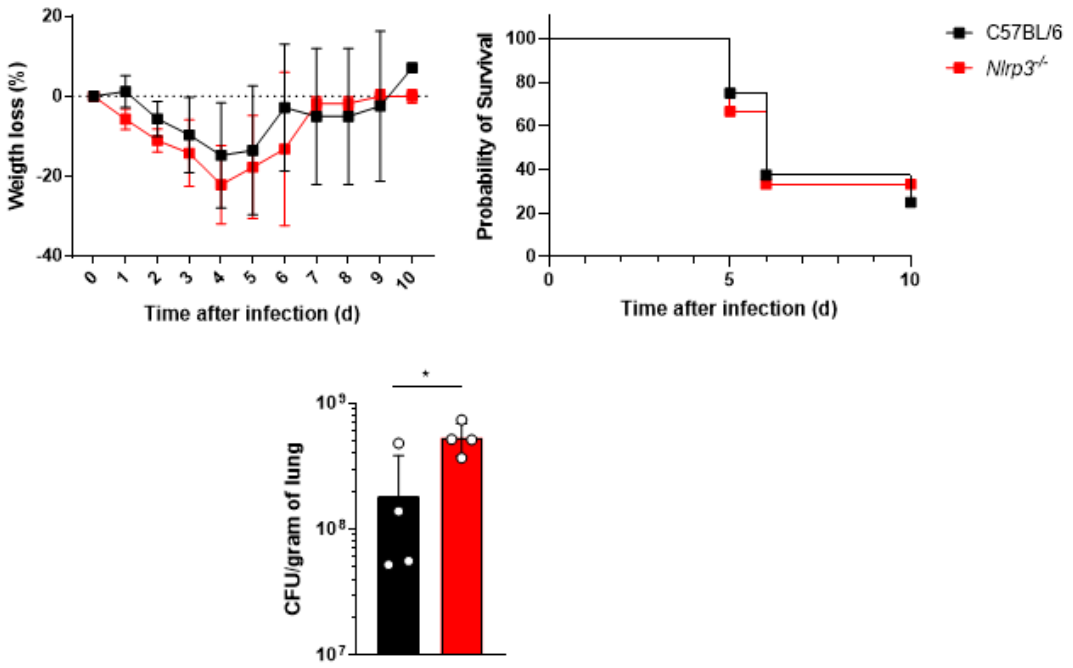


**Figura 13. O inflamassoma de NLRP3 é dispensável no controle da infecção por *L. longbeachae*.** Animais C57BL/6 (N = 10) e *Aim2*$^{-/-}$ (N =6) foram infectados com 1X10$^{6}$ CFU de *L. longbeachae* e a perda de peso **(a)** e a sobrevida **(b)** foram avaliadas ao longo de 10 dias. **(c)** Animais com estes mesmo genótipos, sendo 4 animais por grupo, foram infectados com 1X10$^{5}$ CFU de *L. longbeachae*, após 3 dias de infecção os animais foram sacrificados e a carga bacteriana do pulmão destes camundongos foi acessada. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados independentemente e estão expressos como média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste de classificação logarítmica de Mantel-Cox para **(a)** e **(b)** e *t* de Student não pareado para **(c)**. Valores de P < 0,05 (*)

Dados publicados anteriormente por nosso grupo de pesquisa evidenciaram que animais deficients para as caspases-1 e 11tem suscetibilidade a infecção por *L. longbacheae* similar a observada em animais selvagens (PEREIRA, *et al*, 2011) e, no presente estudo nós encontramos um papel protetor para a morte celular piroptótica. Então decidimos avaliar *in vitro* a clivagem de GSDMD em animais deficientes para diferentes componentes do inflamassoma (**Fig. 14**). Encontramos uma clivagem forte de GSDMD

nos animais selvagens infectados, essa clivagem é reduzida, porém ainda ocorre em animais *Casp1/11*$^{-/-}$ e é totalmente perdida em animais *Asc/ Casp1/11*$^{-/-}$. Nossos dados indicam que a *L. longbeachae* induz forte clivagem de GSDMD *in vitro*, essa clivagem é realizada mesmo na ausência de Casp1/11 e é dependente de ASC (**Fig. 14**).

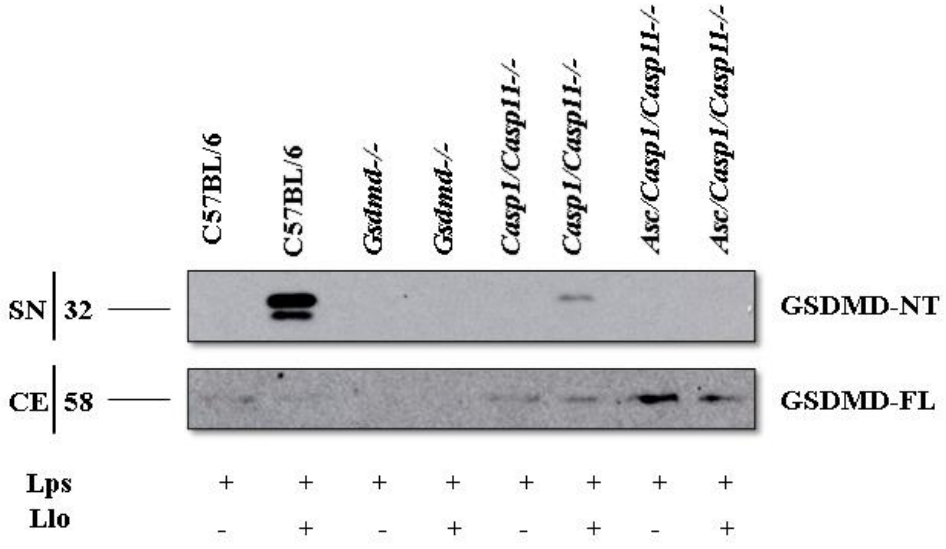


**Figura 14. Macrófagos derivados de Medula óssea (BMDMs) primados promovem clivagem de GSDMD em resposta a infecção por *L. longbeachae* (MOI: 10), mesmo na ausência das caspase-1 e 11.** BMDMs (1X10$^{6}$ células por poço) foram primados por 4 horas com Lipopolissacarídeo (LPS) e em seguida infectados, ou não, com *L. longbeachae* com MOI: 10. Após 4 horas de infecção o lisado celular e o sobrenadante da cultura foram coletados para avaliação da clivagem de GSDMD por *western bloting*. Os dados mostrados são um experimento de um experimento realizado.

## 6. DISCUSSÃO

Estudos realizados em modelo murino de doença dos Legionários já demonstraram que a *L. longbeachae* é significativamente mais virulenta que a *L. pneumophila*. Muito se discute sobre quais fatores seriam importantes para este fenômeno, já foi especulado que a ausência de flagelina na *L. longbeachae* poderia ser o fator determinante, no entanto esta bactéria ainda é extremamente mais virulenta que a *L. pneumophila ΔFlaA*, o que descarta esta hipótese. Acredita-se que a presença da cápsula que envolve a bactéria possa ser um fator de virulência importante, visto que animais infectados com a bactéria mutante para a cápsula são menos suscetíveis a infecção quando comparados aos infectados pela bactéria selvagem. Adicionalmente, macrófagos de humanos e de camundongos infectados *in vitro*, com a *Legionella* mutante para a cápsula tem maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNFα e IFNγ, que aqueles infectados com a bactéria selvagem. Estas citocinas parecem ser cruciais no controle da bactéria, uma vez que os seus respectivos *knockouts* foram extremamente suscetíveis a infecção (MASSIS, et al, 2015).

Sabemos que o IFNγ é um indutor clássico de produção de NO (MICKING, 2012), então esperávamos que, assim como o IFNγ, o NO tivesse um papel protetor. No entanto, nossos dados apontam um papel detrimental do NO na infecção por *L longbeachae*. Descobrimos que a quantidade de células mieloides $NOS2^+$ é extremamente elevada em animais infectados pela *L longbeachae* que a observada em animais infectados com *L pneumophila* (**Fig. 4**), bactéria que causa uma infecção mais branda e é rapidamente eliminada em camundongos selvagens (PEREIRA, *et al*, 2011; MASSIS, et al, 2017; GONÇALVES, *et al*, 2019). Os camundongos deficientes para produção de NO possuem acentuada resistência a infecção (**Fig. 6**), bem como elevada produção de IL-12 (**Fig. a;**

**d; g**), citocina com seu papel crítico no controle da infecção já relatado anteriormente por nosso grupo de pesquisa (MASSIS, et al, 2017).

Este aumento da produção de IL-12 em animais deficientes para NOS2 corrobora com a nossa hipótese de que o NO regula negativamente a resposta inflamatória ainda em um período de presença massiva do patógeno no pulmão do camundongo. Um mecanismo parecido foi descoberto na resposta a *Leishmania major*, foi demonstrado que a produção de NO pelas células derivadas de monócitos promove o desligamento da resposta imune, porém após o fim da infecção, agindo de forma benéfica ao assegurar o retorno do organismo a homeostase (POSTAT, et al, 2018).

Classicamente, o NO é uma molécula microbicida (MICKING, 2012; LIMA-JUNIOR, et al 2013), no entanto, sua produção deve ser rigidamente regulada afim de se evitar um estresse oxidativo prejudicial ao organismo hospedeiro (SANMARCO, et al, 2017). No presente estudo encontramos sua atividade deletéria no contexto da infecção por *L. longbeachae* (**Fig. 6**) e decidimos investigar mais aprofundadamente como o NO favorece a infecção pela bactéria. A atividade prejudicial do NO também já foi relatada em outros modelos, como no caso da infecção por *Trypanosoma cruzi* (SANMARCO, et al, 2017).

Recentemente foi demonstrado que durante a sepse a NOS2 interage com a Rac-2 em neutrófilos e seus produtos, NO e $O_2^-$, respectivamente, se combinam para formar $ONOO^-$, molécula capaz de induzir hiperativação de neutrófilos e promover a formação aberrante de NETs no ambiente pulmonar e provocar morte de células epiteliais, culminando no agravamento da doença (WANG, et al, 2012; KUMAR, et al, 2021). Estas descobertas, parcialmente, corroboram com nossos resultados, posto que encontramos uma forte tendência ao aumento de NETs no BAL de animais deficiente em produção de NO infectados com *L. longbeachae*, quando comparados com animais selvagens (**Fig. 8**).

Logo, a produção de NO pode estar induzindo a formação aberrante de NETs e promovendo dano tecidual, amplificando uma resposta inflamatória desregulada, o que é compatível com os elevados níveis de IL-1β e IL-6 encontrados no pulmão e no BAL de animais selvagens (**Fig 7b, 7c, 7e, 7f**). Esta produção aberrante de NETs, IL-1β e IL-6 já foi relatada na patogênese de algumas doenças respiratórias como a COVID 19 e asma (LAPPALAINEN, et al, 2005; VERAS, et al, 2020; RODRIGUES, 2021). Juntos, estes fatores atuariam para comprometer a homeostase do órgão e dificultar a formação de uma resposta imune eficiente contra o patógeno.

Nossos resultados também apontam que a morte celular é um mecanismo protetor na infecção contra a *L. longbeachae*. Aparentemente, a morte celular prioptótica é um fenômeno regulador da produção de NO em neutrófilos, posto que animais deficientes em GSDMD apresentam um alto infiltrado de células $CD45^+/CD11b^+/Ly6G^+/$ $LY6C^-$ expressando NOS2 quando comparados aos animais C57BL/6, no terceiro dia após a infecção (**Fig. 9**). No entanto ainda não sabemos exatamente em que estágio da resposta esta regulação é realizada.

Como a piroptose já é classicamente conhecida por induzir proteção contra patógenos intracelulares via eliminação de nicho replicativo (MIAO, et al, 2010; VELOSO, et al, 2019), especulamos que ela pode estar atuando na eliminação das células infectadas pela bactéria. Outra possibilidade a ser avaliada é que a morte celular esteja ocorrendo nos neutrófilos recrutados para o sítio infeccioso, promovendo a redução do número de neutrófilos $NOS2^+$ e regulando a produção aberrante de NO e consequentemente a redução dos danos gerados por ele.

Na tentativa de elucidar os inflamassomas que envolvidos na proteção contra a infecção por *L. longbeachae*, avaliamos a resposta de animais deficientes para AIM2 (**Fig. 12**) e NLRP3 (**Fig. 13**), separadamente. Ambos os animais foram igualmente suscetíveis

aos selvagens, após a infecção pela bactéria, no que tange a sobrevida e a perda de peso, no entanto encontramos uma carga bacteriana mais elevada nos animais deficientes para NLRP3 (**Fig. 13**), indicando que este inflamassoma participa da resposta a *L. longbeachae*, mas que outros inflamassomas conseguem atuar na sua ausência. Especulamos que ambos os inflamassomas de AIM2 e NLRP3 atuam na resposta ao patógeno, um podendo suprir a ausência do outro na promoção de imunidade, sendo necessária a avaliação de animais duplo-*knockout* para ambos inflamassomas para resolver esta questão.

Ainda na busca por componentes dos inflamassomas com relevância no combate a infecção por *L. longbeachae*, decidimos avaliar *in vitro* a clivagem de GSDMD em BMDMs deficientes para diferentes proteínas envolvidas na morte celular piroptótica. Encontramos uma forte clivagem de GSDMD induzida em macrófagos oriundos de animais selvagens, esta clivagem foi mantida, porém em níveis mais baixos, mesmo na ausência da caspase-1 e -11 (**Fig. 14**). Nosso grupo de pesquisa já demonstrou anteriormente que estas caspases são dispensáveis na resposta a *L. longbeachae*, posto que sua ausência não acarretou implicações na susceptibilidade dos animais (PEREIRA, *et al*, 2011). Então inferimos que esta clivagem, mesmo que reduzida, de GSDMD em animais *Casp1/11*$^{-/-}$ seria suficiente para assegurar a estes animais a mesma proteção encontrada nos selvagens. Esta clivagem é totalmente perdida em animais *Asc/Casp1/11*$^{-/-}$, ou seja, na ausência das caspases 1 e 11 ocorre clivagem de GSDMD dependente de ASC (**Fig. 14**). É importante ressaltar que estes animais são extremamente suscetíveis a infecção (**Fig. 10**), o que nos permite inferir que de fato a morte celular induzida pela clivagem de GSDMD é uma etapa crucial para a defesa do hospedeiro a infecção. Adicionalmente, inferimos que na ausência das caspases-1 e 11, o recrutamento da caspase-8 pelo AIM2 pode ser crítico para a clivagem de GSDMD e formação de uma

resposta robusta contra a bactéria, uma vez que já foi demonstrada a clivagem de GSDMD pela caspase-8 (SARHAN, *et al*, 2018; ORNING, *et al*, 2018), bem como a capacidade do AIM2 em ativar esta caspase de forma dependente de ASC (PIERINI, et al, 2012).

## 7. CONCLUSÃO

Reportamos pela primeira vez neste trabalho uma forte indução de expressão de NOS2 em células mieloides induzida por *L. longbeachae*. Surpreendentemente o NO se mostrou uma molécula deletéria na resposta a bactéria, levando a redução de IL-12 e elevação dos níveis de IL-1β e IL-6, bem como aumento considerável na produção de NETs. Adicionalmente, descobrimos que a morte celular dependente de GSDMD é um mecanismo importante para o controle bacteriano. Aparentemente, a piroptose regula a produção de NO por neutrófilos para promover resistência do hospedeiro à infecção (**Fig. 15**).

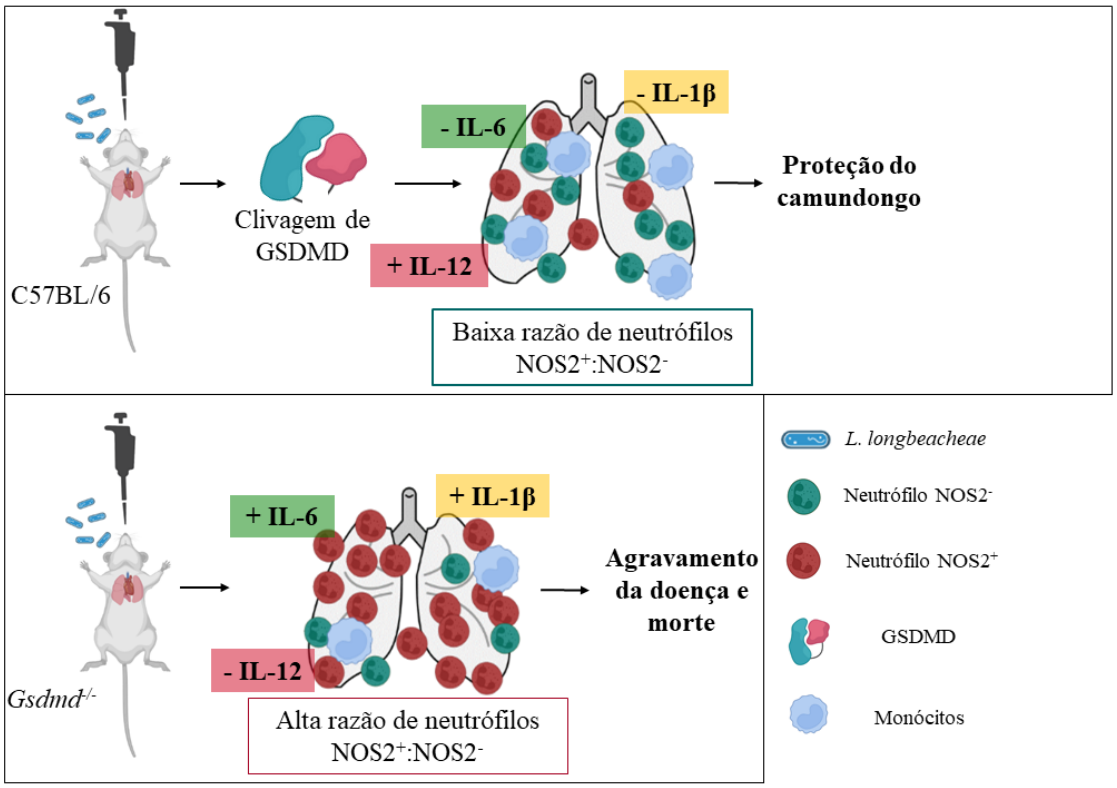


**Figura 15. Resumo.** A clivagem de GSDMD ocorrida em resposta a infecção por *L. longbechae* regula o infiltrado de neutrófilos NOS2$^+$ no pulmão de animais selvagens infectado para regular a produção aberrante de NO e promover resistência do organismo hospedeiro à infecção. Na ausência de morte celular dependente de GSDMD, ocorre um descontrole na geração de neutrófilos NOS2$^+$, mecanismo que se correlaciona com um agravamento da doença e aumento de mortalidade.

## 8. REFERÊNCIAS

AKIRA, SHIZUO. "Pathogen recognition by innate immunity and it's signaling." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 85.4 (2009): 143-156.

BROWN, ANDREW S., et al. "Cooperation between monocyte-derived cells and lymphoid cells in the acute response to a bacterial lung pathogen." *PLoS pathogens* 12.6 (2016): e1005691.

BROZ, PETR, and VISHVA M. DIXIT. "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling." *Nature Reviews Immunology* 16.7 (2016): 407-420.

BROZ, PETR, and VISHVA M. DIXIT. "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling." *Nature Reviews Immunology* 16.7 (2016): 407-420.

BROZ, PETR. "Caspase target drives pyroptosis." *Nature* 526.7575 (2015): 642-643.

BUCHMANN, KURT. "Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals." *Frontiers in immunology* 5 (2014): 459.

CASSON, CIERRA N., et al. "Neutrophils and Ly6Chi monocytes collaborate in generating an optimal cytokine response that protects against pulmonary Legionella pneumophila infection." *PLoS pathogens* 13.4 (2017): e1006309.

CAZALET, CHRISTEL, et al. "Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease." *PLoS genetics* 6.2 (2010): e1000851.

CHAMBERS, STEPHEN T., et al. "Legionellosis caused by non-Legionella pneumophila species, with a focus on *Legionella longbeachae*." *Microorganisms* 9.2 (2021): 291.

CHOVATIYA, RAJ, and RUSLAN MEDZHITOV. "Stress, inflammation, and defense of homeostasis." *Molecular cell* 54.2 (2014): 281-288.

COLÓN, DAVID F., et al. "Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis." *Critical Care* 23.1 (2019): 1-13.

CUNHA, LARISSA D., et al. “AIM2 engages active but unprocessed caspase-1 to induce noncanonical activation of the NLRP3 inflammassome.” *Cell reports* 20.4 (2017): 794-805.

CZAIKOSKI, PAULA GISELLE, et al. "Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis." *PloS one* 11.2 (2016): e0148142.

DANYANG, LI and MINGHUA WU. “Pattern recognition receptors in health and diseases.” *Signal transduction and targeted therapy* 6.1 (2021): 1-24.

DINARELLO, CHARLES A. "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annual review of immunology* 27 (2009): 519-550.

DUNKELBERGER, JASON R., and WEN-CHAO SONG. “Complement and it’s role in innate and adaptative immune responses.” *Cell research* 20.1 (2010): 34-50.

FRASER, DAVID W., et al. "Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia." *New England Journal of Medicine* 297.22 (1977): 1189-1197.

GAO, WENQING, et al. "TRIM21 regulates pyroptotic cell death by promoting Gasdermin D oligomerization." *Cell Death & Differentiation* 29.2 (2022): 439-450.

GONÇALVES, AUGUSTO V., et al. "Gasdermin-D and Caspase-7 are the key Caspase-1/8 substrates downstream of the NAIP5/NLRC4 inflammasome required for restriction of Legionella pneumophila." *PLoS pathogens* 15.6 (2019): e1007886.

JANEWAY JR, CHARLES A., and RUSLAN MEDZHITOV. "Innate immune recognition." *Annual review of immunology* 20.1 (2002): 197-216.

KOVACS, STEPHEN B., and EDWARD A. MIAO. "Gasdermins: effectors of pyroptosis." *Trends in cell biology* 27.9 (2017): 673-684.

LAPPALAINEN, URPO, et al. "Interleukin-1β causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32.4 (2005): 311-318.

LAVELLE, ED C., et al. "The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis." *Mucosal immunology* 3.1 (2010): 17-28.

LAVELLE, ED C., et al. "The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis." *Mucosal immunology* 3.1 (2010): 17-28.

LIMA-JUNIOR, DJALMA S., et al. "Inflammasome-derived IL-1β production induces nitric oxide–mediated resistance to Leishmania." Nature medicine 19.7 (2013): 909-915.

LIU, XING, et al. "Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores." *Nature* 535.7610 (2016): 153-158.

LIU, ZHONGHUA, et al. "Crystal structures of the full-length murine and human gasdermin D reveal mechanisms of autoinhibition, lipid binding, and oligomerization." *Immunity* 51.1 (2019): 43-49.

LIU, ZHONGHUA, et al. "Structures of the gasdermin D C-terminal domains reveal mechanisms of autoinhibition." *Structure* 26.5 (2018): 778-784.

MACMICKING, JOHN D. "Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity." *Nature Reviews Immunology* 12.5 (2012): 367-382.

MAO, KAIRUI, et al. "Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock." *Cell research* 23.2 (2013): 201-212.

MASCARENHAS, DANIELLE PA, and Dario S. Zamboni. "Inflammasome biology taught by Legionella pneumophila." *Journal of Leukocyte Biology* 101.4 (2017): 841-849.

MASSIS, LILIANA M., et al. "*Legionella longbeachae* is immunologically silent and highly virulent in vivo." *The Journal of infectious diseases* 215.3 (2017): 440-451.

MARIATHASAN, SANJEEV et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, v. 440, n. 7081, p. 228-232, 2006.

MASSIS, LILIANA M., et al. "*Legionella longbeachae* is immunologically silent and highly virulent in vivo." *The Journal of infectious diseases* 215.3 (2017): 440-451.

MEDZHITOV, RUSLAN. "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." *Nature* 449.7164 (2007): 819-826.

MEDZHITOV, RUSLAN. "Toll-like receptors and innate immunity." *Nature Reviews Immunology* 1.2 (2001): 135-145.

MIAO, EDWARD A., et al. "Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria." *Nature immunology* 11.12 (2010): 1136-1142.

NETEA, MIHAI G., et al. "Defining trained immunity and its role in health and disease." *Nature Reviews Immunology* 20.6 (2020): 375-388.

ORNING, PONTUS, et al. "Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8–dependent cleavage of gasdermin D and cell death." *Science* 362.6418 (2018): 1064-1069.

PALUDAN, SØREN R., et al. “Constitutive immune mechanisms: mediators of host defense and immune regulation”. *Nature reviews immunology* 21.3 (2021): 137-150.

PEREIRA, MARCELO SF, et al. "The Nlrc4 inflammasome contributes to restriction of pulmonary infection by flagellated Legionella spp. that trigger pyroptosis." *Frontiers in microbiology* 2 (2011): 33.

PIERINI, R., et al. "AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in Francisella-infected caspase-1-deficient macrophages." *Cell Death & Differentiation* 19.10 (2012): 1709-1721.

REHWINKEL, JAN, and MICHAELA U. GACK. "RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing." *Nature Reviews Immunology* 20.9 (2020): 537-551.

REHWINKEL, JAN, and MICHAELA U. GACK. "RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing." *Nature Reviews Immunology* 20.9 (2020): 537-551.

RICHARDS, ASHLEY M., et al. "Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella–amoeba interaction." *Virulence* 4.4 (2013): 307-314.

RICKLIN, DANIEL, et al. “Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis.” *Nature immunology*, 11.9 (2010): 785-797.

RODRIGUES, TAMARA S., et al. "Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients." Journal of Experimental Medicine 218.3 (2021).

SANMARCO, LILIANA M., et al. "IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during Trypanosoma cruzi infection." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1863.4 (2017): 857-869.

SARHAN, JOSEPH, et al. "Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during Yersinia infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.46 (2018): E10888-E10897.

SCHNEIDER, DAVID S., and JANELLE S. AYRES. "Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases." *Nature Reviews Immunology* 8.11 (2008): 889-895.

SHI, JIANJIN, et al. "Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death." *Nature* 526.7575 (2015): 660-665.

SIRONI, MANUELA, et al. "Evolutionary insights into host–pathogen interactions from mammalian sequence data." *Nature Reviews Genetics* 16.4 (2015): 224-236.

SMITH, NICOLE C., MATTHEW L. RISE, and SHERRI L. CHRISTIAN. "A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish." *Frontiers in immunology* (2019): 2292.

SWANSON, KAREN V., MENG DENG, and JENNY P-Y. TING. "The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics." *Nature Reviews Immunology* 19.8 (2019): 477-489.

TAKEUCHI, OSAMU, and SHIZUO AKIRA. "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* 140.6 (2010): 805-820.

TENTHOREY, JEANNETTE L., et al. "The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion." *Science* 358.6365 (2017): 888-893.

TING, JENNY P-Y., STEPHEN B. WILLINGHAM, and DANIEL T. BERGSTRALH. "NLRs at the intersection of cell death and immunity." *Nature Reviews Immunology* 8.5 (2008): 372-379.

Veras, Flavio Protasio, et al. "SARS-CoV-2–triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology." Journal of Experimental Medicine 217.12 (2020).

WANG, HUIMENG, et al. "MAIT cells protect against pulmonary *Legionella longbeachae* infection." *Nature communications* 9.1 (2018): 1-15.

WANG, LEFENG, et al. "Specific role of neutrophil inducible nitric oxide synthase in murine sepsis-induced lung injury in vivo." *Shock* 37.5 (2012): 539-547.

WHILEY, HARRIET, and RICHARD BENTHAM. "*Legionella longbeachae* and legionesis." *Emerging infectious diseases* 17.4 (2011): 579.

WU, YINYU, and KAREN K. HIRSCHI. "Tissue-resident macrophage development and function." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2021): 1750.

XIA, SHIYU, et al. "Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1." *Nature* 593.7860 (2021): 607-611.

ZAMBONI, DARIO S., et al. "The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection." *Nature immunology* 7.3 (2006): 318-325.