

LAURA MIGLIARI BRANCO

**Mecanismos moleculares envolvidos na ativação do
inflamassoma NAIP/NLRC4**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2019

LAURA MIGLIARI BRANCO

**Mecanismos moleculares envolvidos na ativação do inflamassoma
NAIP/NLRC4**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci

Versão original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Migliari Branco, Laura
Mecanismos Moleculares envolvidos na ativação do
inflamassoma NAIP/NLRC4 / Laura Migliari Branco;
orientadora Karina Ramalho Bortoluci. -- São Paulo,
2019.
112 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. NLRC4. 2. IL-1beta. 3. Lisossomo. 4.
Cathepsina. 5. Flagelina. I. Ramalho Bortoluci,
Karina, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Laura Migliari Branco

Titulo da Tese: Mecanismos Moleculares envolvidos na ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4

Orientador: Karina Ramalho Bortoluci

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a _____/_____/_____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

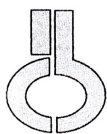
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **46** nas fls. **18** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Karina Ramalho Bortoluci**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Imunobiologia do reconhecimento immune inato*" do qual participam o(s) aluno(s) **Laura Migliari Branco, Kely Catarine Matteucci, Silvia Lucena Lage, Carina Buzzo de Lima, Thais Boccia da Costa, Carla Longo de Freitas**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **07.07.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 10 de julho de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

, 07 de março de 2016
CEUA N 9515131015

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Laura Migliari Branco
Depto/Disc: Ciências Biológicas
Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci (orientador)

Título do projeto: "Interação entre os inflamassomas NLRP3 e NLRC4 na ativação de macrófagos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

Os inflamassomas são complexos proteicos de alto peso molecular formados após o reconhecimento de patógenos ou de sinais de dano (DAMPs) no citosol celular. Após a ativação, os inflamassomas ativam a caspase-1 e caspase-11 e medeiam o processamento e a secreção das citocinas inflamatórias IL-1b e IL-18 e a morte celular por piroptose. Mais recentemente, novas funções efetoras foram atribuídas aos inflamassomas, como ativação de enzimas envolvidas na capacidade microbicida de macrófagos, liberação de DAMPs e de mediadores lipídicos e ativação da resposta imune adaptativa. Dentre os inflamassomas, os melhor caracterizados são NLRP3 e NAIP/NLRC4. O inflamassoma NLRP3 é ativado por uma diversidade de estímulos como patógenos virais, fungos, protozoários e bactérias, DAMPs e toxinas bacterianas formadoras de poros, como a nigericina. O inflamassoma NAIP/NLRC4 reconhece proteínas do sistema de secreção e a flagelina de bactérias virulentas que atingem o citoplasma. Dados recentes sugerem que diferentes inflamassomas possam interagir, atuando juntos para montar respostas adequadas frente a patógenos. Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo vão de acordo com a literatura, uma vez que sugerem que, em macrófagos peritoneais, os receptores NLRC4 e NLRP3 interagem funcionalmente frente à flagelina e à nigericina. Contudo, ainda não está claro como essas proteínas interagem e tampouco o reflexo dessa interação para a ativação dos mecanismos efetores dos inflamassomas. A compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela formação e regulação da atividade dos inflamassomas é de extrema importância para a identificação de possíveis alvos para o tratamento de doenças infecciosas e patologias inflamatórias relacionadas ao funcionamento inadequado dessas maquinarias moleculares. Nesse trabalho, pretendemos elucidar como ocorre a interação entre NLRC4 e NLRP3 em resposta à flagelina citosólica e à nigericina.

ANIMAIS - Serão utilizados:

180 Camundongos isogênico C57BL/6, Fêmeas, idade: 6-8 semanas
16 Camundongos Knockout Asc-KO, Fêmeas, idade: 6-8 semanas
20 Camundongos Knockout Caspase1-KO, Fêmeas, idade: 6-8 semanas
80 Camundongo Knockout Cias1(nalp3)-KO, Fêmeas, idade: 6-8 semanas
70 Camundongo Knockout Ipaf-KO, Fêmeas, idade: 6-8 semanas

Procedência: CEDEME

Manutenção: Biotério Centro de Terapia Celular e Molecular: CTC-Mol Unifesp

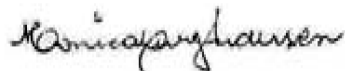
VIGÊNCIA DO ESTUDO

Início previsto para: 02/2016 com término previsto para: 12/2017

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 17/12/2015, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente



Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Aos meus pais, Pedro e Maura.

AGRADECIMENTOS

Nessa longa travessia que foi o doutorado não foram poucas as pessoas que me ajudaram a ter coragem e seguir apesar de todas as dúvidas no caminho. A minha jornada pela busca começou muito antes do doutorado e cabe agora nesse espaço agradecer a quem me guiou, apoiou e me inspirou nesse caminho.

Primeiramente, agradeço aos meus pais por nos incentivarem a querer saber e por querer mudar o mundo. Obrigada por cada livro, por cada visita a exposições, oficinas culturais e por cada viagem. Obrigada também por me criarem em um ambiente acolhedor e por me darem a oportunidade de ser a irmã mais nova da Maíra, do João e do Luís. Vocês são a minha grande inspiração e também a minha fortaleza. Obrigada aos agregados que vocês trouxeram para a minha vida. Dos privilégios que tenho na vida, nada se compara a minha família.

Obrigada a minha avó Neguita e aos meus sobrinhos Pablo, Alice e Clarice por me lembrarem como é divertido fazer ciência e também que mais importante do que responder é perguntar.

Aos meus primos-irmãos Júlia, Natália, Matheus e Bia por serem a ampliação da minha fortaleza. A minha tia Carla por ir até os astros para nos proteger e nos guiar. Ao meu avô Hélio pelo carinho enquanto estive aqui.

Ao Maurício pelo apoio incondicional. Nosso amor nasceu e floresceu junto com o meu doutorado. Você é o meu descanso da loucura, meu refúgio quando tudo parece dar errado e o meu maior incentivador a ser uma pessoa melhor todos os dias. O nosso amor não cabe.

Aos meus amigos de toda uma vida: Fê, minha irmã de alma. Na nossa amizade, inflamassomas e colunas góticas convivem em harmonia. O que aprendemos e construímos juntas é de um valor inestimável. A Bá, por seguirmos tão próximas, nos apoiarmos mutuamente e crescermos juntas. Ao Biba, por me ensinar função e sempre sonhar junto. Aos amigos da escola Má Freire, Má Iki, Gabi Cernic,

Gabi Neves, Bá Regis, Bia, Luca e Carol. Mesmo sem entender nada do meu universo, vocês ouviram com carinho cada explicação científica, dividiram os momentos de angústia e compartilharam tantas alegrias comigo. Vocês são a minha identidade.

Aos amigos da Unicamp Nádia, Bruce, Nove, Bia, Baiano, Caio, Suzuki, Pitty e Nati Rê. Mesmo espalhados por todos os cantos desse mundo nos mantivemos juntos. Aprendi muito com vocês dentro e fora da sala de aula durante nossos anos de graduação e sigo aprendendo. Me orgulho muito de poder chamá-los de amigos.

Aos amigos quase franceses Rodrigo e a Bianca, por todo o apoio.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que tive a chance de conhecer durante essa jornada: Priscila, Virgínia, Thaís, Carla, Kely, Felipe e Ingrid. Ao Marcelo pelas discussões científicas e de escolhas profissionais. Ao Isaú pelas risadas na hora do café. Obrigada em especial às amigas que dividi mais do que a bancada, mas também a vida: Sil, que me acolheu e me ensinou tudo sobre inflamassomas e nas horas de descuido me mostrou como ser mais humana; Carinhinha por me ensinar a ter rigor técnico e que sempre é possível ouvir e evoluir; Aline por todo o companheirismo e um amor que transborda; Gabi por me ensinar que mar tranquilo não faz boa marinheira; Bá por dividir as angústias, ouvir e me acolher; Camila por partilhar o caminho, pelas cantorias desafinadas e pela enorme perseverança; Bianca pelos conselhos e pela amizade que quebrou as barreiras dos laboratórios. Vocês deram leveza aos meus dias e me provaram que a amizade pode brotar em qualquer lugar. Obrigada àquelas que vieram depois de mim e me deram a chance de ensinar (ou seria aprender?): Babi, Mari, Suellen e especialmente a Luiza. Aprendi muito mais com vocês do que o contrário.

A minha orientadora Karina por ter dividido essa jornada comigo. Obrigada por me guiar com maestria, me dar limites quando eu precisei e especialmente por acreditar em mim e me apoiar sempre. Você me ensinou a ser cientista e é a grande parceira dessa história que se encerra e também se inicia. Me inspiro em você.

Ao professor Maurício Rodrigues por nos acolher e nos inspirar. Ao professor Ronnie Vasconcelos e a todos os seus alunos por deixarem a rotina mais divertida. Aos professores Sang e Hugo por compartilharem equipamentos conosco.

Ao professor Bernardo Franklin por ter me recebido de maneira tão generosa em seu laboratório. Obrigada por me ensinar as melhores práticas de ciência, como representar e apresentar dados e especialmente por me acolher no AG Franklin. Obrigada ao Lucas, por ter sido meu amigo e anfitrião e pelas discussões científicas; à Marina pelas nossas histórias que se confundem, se complementam e por todo o seu amor; *Muchas gracias* à Nathalia por toda a ajuda experimental, por me confiar seus filhos e pela parceria latino americana; ao Juan por sua disponibilidade em me ajudar e ensinar técnicas novas, pelas discussões científicas e pela sua amizade; *Vielen Dank* a Conny por sua doçura e apoio técnico; ao Ibrahim pelo seu coração enorme e uma amizade cheia de saudade; à Verena por ser um exemplo de mulher forte e ser a amiga que sabe estar presente como se não houvesse um oceano nos separando. À Agni por me permitir ensinar e não desistir mesmo quando tudo dá errado; *Thanks to Wang* pela sua amizade tão pura, pelos *hot pot* e por suas músicas; ao Matt por todas as discussões científicas; ao Tom por sempre me amparar e me ensinar a usar os microscópios. Ao Max, Guddy e Gabor pelo apoio técnico. *Vielen Dank* também ao prof. Eike Latz e ao Dr. Florian Schimdt e aos demais pesquisadores, técnicos e secretárias do Instituto de Imunidade Inata. Vocês não mediram esforços para me ajudar e por me mostrarem que ciência é pensar sem barreiras.

Obrigada ao Henrique, à Daphne e à Luna. Vocês foram (e ainda são) a minha família em Colônia. à María, Christopher, Elisa e Leo por serem a minha família em Bochum. A Aline por uma amizade improvável e que dá muito certo.

À Betty e a todos os técnicos de laboratório. Vocês fazem o trabalho essencial que permite que a máquina continue girando e para que possamos fazer o nosso trabalho da melhor forma possível. Às equipes de segurança e de limpeza que cuidam do CTC-Mol. À Maria Eni por sempre nos dar o suporte necessário.

A todos os animais utilizados para realizar essa pesquisa.

A todos os doadores de sangue.

A todos os professores e pesquisadores que me ensinaram.

Aos membros da banca que aceitaram nosso convite e me cederam o seu valioso tempo para discutirmos ciência.

As agências de fomento CAPES, CNPq e especialmente à FAPESP pelo apoio fundamental. Sem investimento, não há ciência.

Trabalho realizado no laboratório de Imunobiologia Molecular e Desenvolvimento de Vacinas Recombinantes contra Protozoários Patogênicos do Centro de Terapia Celular e Molecular da Universidade Federal de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci. Projeto Financiado pela CAPES, CNPq e FAPESP e realizado com bolsa de mestrado FAPESP, nº. 2013/13823-5, doutorado direto FAPESP 2015/09029-7 e bolsa BEPE FAPESP 2017/21814-7

*“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só fazer
outras maiores perguntas.”*

João Guimarães Rosa

Branco LM. Mecanismos moleculares envolvidos na ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

RESUMO

Inflamassomas são complexos moleculares intracelulares formados após a detecção de estímulos estéreis ou infecciosos que desencadeiam a ativação da caspase-1, levando à liberação de IL-1 β , IL-18 e a morte celular por piroptose. Dentre os inflamassomas estudados, destacam-se os formados pelas proteínas NLRP3 e NLRC4. O inflamassoma NLRP3 atua como um sensor da homeostase celular e é ativado após a geração de distúrbios citosólicos gerados por estímulos derivados de patógenos ou do hospedeiro. Já os inflamassomas formados por NAIP/NLRC4 são classicamente associados com a detecção de proteínas de T3SS/T4SS e flagelina de bactérias patogênicas que alcançam o citoplasma. Contudo, diversos estudos sugerem que essas plataformas moleculares podem conter mais de um NLR e que vias citoplasmáticas acessórias são capazes de amplificar a resposta mediada pelos inflamassomas. Nesse sentido, nosso grupo demonstrou que a estimulação de macrófagos com flagelina derivada de *B. subtilis* desencadeia uma via lisossomal que contribui para a secreção de IL-1 β por uma via não completamente estabelecida. No presente trabalho, descrevemos que as catepsinas lisossomais e o influxo de Ca²⁺ dessa organela contribuem para a secreção de IL-1 β em resposta à flagelina de *S. typhimurium* entregue ao citoplasma diretamente ou com o auxílio de vesículas de transfecção, de maneira independente da indução de morte celular. Embora esteja estabelecido na literatura que o dano lisossomal é uma via comum para a ativação de NLRP3 em resposta à materiais particulados e que esse sensor coopera com NLRC4 para induzir respostas mais potentes frente à infecção com *S. typhimurium*, nossos dados indicam que a via lisossomal desencadeada pela flagelina amplifica a secreção de IL-1 β de maneira independente de NLRP3. Por meio de inibição farmacológica e deleção genética, verificamos que a catepsina B apresenta um papel importante na modulação do inflamassoma em resposta à flagelina. Importante, a inibição das catepsinas não influencia a indução de pró-IL-1 β e produção de TNF- α , descartando o papel dessa protease na fase de *priming* do inflamassoma. Em contrapartida, as catepsinas parecem regular a clivagem/liberação da IL-1 β ativa. Surpreendentemente, a atuação das catepsinas na maturação/secreção de IL-1 β parece acontecer após ou independentemente da formação do complexo inflamassoma, uma vez que a inibição das mesmas não influencia a agregação de *specks* de ASC e nem a maturação de caspase-1. Esses dados mostram que as catepsinas lisossomais regulam as respostas de NAIP/NLRC4 por mecanismos distintos aos descritos para o inflamassoma NLRP3, sugerindo uma atuação dessas proteases em processos não convencionais de clivagem/liberação de IL-1 β . Em conjunto, os resultados obtidos indicam que o inflamassoma NLRC4 é modulado por sinais adicionais à interação entre ligante-receptor. Considerando o emergente papel de NLRC4 em doenças inflamatórias estéreis, a via lisossomal descrita pode contribuir para a inflamação exacerbada decorrente da ativação aberrante de NLRC4 nessas patologias, representando um possível alvo de intervenção terapêutica.

Palavras-chave: NLRC4. IL-1 β . Lisossomo. Catepsina. Flagelina.

Branco LM. Molecular Mechanisms involved in NAIP/NLRC4 inflammasome activation. [PhD thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

ABSTRACT

Inflammasomes are intracellular molecular complexes formed after detection of sterile or infectious stimuli that trigger caspase-1 activation, leading to the release of IL-1 β , IL-18 and cell death by pyroptosis. Among the described inflammasomes, the ones formed by NLRP3 and NLRC4 proteins are the best characterized. NLRP3 inflammasome acts as a sensor of cellular homeostasis and is activated after the generation of cytosolic disturbs generated by pathogen or host-derived stimuli. In contrast, the inflammasomes formed by NAIP/NLRC4 are classically associated with the detection of T3SS/T4SS proteins and flagellin from pathogenic bacteria that reach the cytoplasm. However, several studies suggest that these molecular platforms may contain more than one NLR and that accessory cytoplasmic pathways are capable of amplify inflammasome-mediated responses. In this regard, our group demonstrated that macrophage stimulation with flagellin derived from *B. subtilis* triggers a lysosomal pathway that contributes to the secretion of IL-1 β by a pathway not completely established. In the present work, we describe that lysosomal cathepsins and Ca²⁺ influx from this organelle contribute to the secretion of IL-1 β in response to flagellin from *S. thyphimurium* delivered to the cytoplasm directly or using transfection vesicles, independently of the induction of cell death. Although it is established in the literature that lysosomal damage is a common pathway to promote NLRP3 activation and that this sensor cooperates with NLRC4 to induce more potent responses to *S. thyphimurium* infection, our data indicate that the lysosomal pathway triggered by flagellin amplifies secretion of IL-1 β independently of NLRP3. Through pharmacological inhibition and genetic ablation, we found that cathepsin B plays an important role on inflammasome modulation in response to flagellin. Importantly, the inhibition of cathepsins does not influence the induction of PRO-IL-1 β and the production of TNF- α , ruling out the role of this protease in the priming phase of the inflammasome. Conversely, cathepsins appear to regulate cleavage/release of active IL-1 β . Surprisingly, the role of cathepsins on the maturation/secretion of IL-1 β appears to occur after or independently of the formation of the inflammasome complex, since the inhibition does not influence ASC speck aggregation or caspase-1 maturation. These data show that lysosomal cathepsins regulate NAIP/NLRC4 inflammatory responses by other mechanisms than those described for NLRP3 inflammasome, suggesting that these proteases act in non-conventional IL-1 β cleavage/release processes. Taken together, the results obtained indicate that the NLRC4 inflammasome is modulated by additional signals besides the interaction between ligand-receptor. Considering the emerging role of NLRC4 in sterile inflammatory diseases, the described lysosomal pathway may contribute to the exacerbated inflammation resulting from the NLRC4 aberrant activation in these pathologies, representing a possible target for therapeutic intervention.

Keywords: NLRC4. IL-1 β . Lysosome. Cathepsin. Flagellin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização celular dos receptores TLR e NLR.....	26
Figura 2 - A ativação de TLRs leva à transcrição de genes inflamatórios.....	27
Figura 3 - Inflamassomas canônicos.....	29
Figura 4 - Mecanismos propostos para ativação de NLRP3.....	37
Figura 5 - Ativação dos inflamassomas formados por NAIP/NLRC4.....	39
Figura 6 - Modelo de formação do inflamassoma NAIP5/NLRC4.....	41
Figura 7 - A ativação do inflamassoma induz a morte celular por piroptose.....	48
Figura 8 - Obtenção dos diferentes macrófagos utilizados.....	61
Figura 9 - A flagelina purificada de <i>S. typhimurium</i> , tanto em sua forma livre como inserida em vesículas lipídicas, é capaz de ativar o inflamassoma.....	70
Figura 10 - A flagelina de <i>S. typhimurium</i> induz a ativação do inflamassoma em BMDMs.....	71
Figura 11 - A flagelina induz a secreção de DAMPs.....	72
Figura 12 - A secreção de IL-1 β em resposta à flagelina em PMs é dependente de NLRC4 e parcialmente dependente de NLRP3.....	73
Figura 13 - As catepsinas lisossomais contribuem para secreção de IL-1 β	75
Figura 14: A IL-1 β induzida por flagelina não é regulada por catepsinas em macrófagos humanos.....	77
Figura 15 - A deleção simultânea das catepsinas B,C,S reduz a liberação de IL-1 β	78
Figura 16 - A mobilização de estoques de Ca ²⁺ lisossomais contribui para regular a secreção de IL-1 β	80
Figura 17 - As catepsinas atuam independentemente de NLRP3 na secreção de IL-1 β	81
Figura 18 - As catepsinas lisossomais contribuem com a clivagem de IL-1 β	83
Figura 19 - As catepsinas não são requeridas para induzir a formação de specks de ASC e nem a ativação da caspase-1 em resposta à flagelina.....	84

Figura 20 - A via lisossomal contribui para amplificar a secreção de IL-1 β em resposta à flagelina.....94

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP - do inglês, *adenosine diphosphate*

AIM2 - do inglês, *absent in melanoma 2*

AMPc - do inglês, *adenosine monophosphate cyclic*

ANOVA - do inglês, *analysis of variance*

ASC - do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ATP - do inglês, *adenosine triphosphate*

BAPTA-AM - 1,2-Bis (2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester)

BIR - do inglês, *Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*

BMDM - do inglês, *bone marrow-derived macrophages*

BrEt - brometo de etídio

BsaK - proteína rod do T3SS de *B. thailandensis* fusionada a LFn

Ca²⁺ - Cálcio

Ca-074Me - N-(L-3-trans-Propylcarbonyl-oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline methyl ester

cm² - centímetro quadrado

CAPS - do inglês *cryopyrin-associated periodic fever syndromes*

CARD - do inglês, *caspase activating and recruitment domain*

CASR - do inglês, Ca²⁺ sensing receptor

Cl⁻ - Cloreto

CLIC - do inglês *chloride intracellular channel*

CO₂ - dióxido de carbono

CPPD - do inglês, calcium pyrophosphate dihydrate

Cryo-EM - do inglês *cryogenic electron microscopy*

CTB - do inglês, *Cell Titer Blue*

DAMP - do inglês, *Damage-associated molecular pattern*

DC - do inglês, *Dendritic Cells*

DMEM - meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA - do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DNAm_t - DNA mitocondrial

DOTAP - N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate

E64d - (2S,3S)-3-[[[(1S)-3-Methyl-1-[[[3-methylbutyl]amino]carbonyl]butyl]amino]carbonyl]-2-oxiranecarboxylic acid ethyl ester

ELISA - do inglês, *enzyme-linked immuno sorbent assay*

ERK - do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*

FLADot - flagelina nativa purificada de *B. subtilis* inserida no DOTAP

FlaTox - flagelina fusionada a LT

Fli - flagelina ultrapura nativa purificada de *S. typhimurium*

FliDot - flagelina ultrapura nativa purificada de *S. typhimurium* inserida no DOTAP

GM-CSF - do inglês, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

GSDM - gasdermina

HCl - Ácido clorídrico

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HMGB1 - do inglês, *high-mobility group box 1 protein*

HTRF - do inglês, *Homogeneous Time Resolved Fluorescence*

IEC - do inglês, *intestine epithelial cell*

IFN - Interferon

IL - Interleucina

IL-1R - do inglês, *IL-1 Receptor*

IL-18R - do inglês, *IL-18 Receptor*

i.p. - intraperitoneal

IRF - do inglês, *IFN responsive fator*

JNK - do inglês, *c-Jun N-terminal*

K⁺ - potássio

KCl - cloreto de potássio

LF - do inglês, *Bacillus anthracis* lethal factor

LFn - domínio N-terminal do LF

LPS - lipopolissacarídeo bacteriano

LRR - do inglês, *leucin rich repeat*

LRRK2 - do inglês *LRR kinase 2*

LT - do inglês, *lethal toxin* do antrax de *Bacillus anthracis*

mM - milimolar

M - Molar

MAPK - do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinase*

MAS - do inglês, *macrophage activation syndrome*

M-CSF - do inglês, *macrophage colony stimulating factor*

ml - mililitro

MSU - do inglês, *monosodium urate crystals*

MYD88 - do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*

NaCl - cloreto de sódio

NADPH - do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

NAIP - do inglês, *NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein*

NBD - do inglês, *nucleotide-binding domain*

Ned19 - 1-(3-((4-(2-Fluorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-4-methoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid

NEK7 - do inglês, *NIMA [never in mitosis gene a]-related kinase 7*

NF-κB - do inglês, *nuclear factor-κB*

ng - nanograma

NO - do inglês, *nitric oxide*

NLR - do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD), leucine-rich repeat (LRR)-containing protein*

NLRC - do inglês, *NLR family, CARD domain containing*

NLRP - do inglês, *NLR family pyrin domain*

NOD - do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain*

NOS2 - do inglês, *Nitric Oxide Synthase 2*

OptiMem - meio de cultura *improved Minimal Essential Medium*

PA - do inglês, *protective antigen de B. anthracis*

PAMP - do inglês, *Pathogen associated molecular pattern*

PBS - do inglês, *phosphate buffered saline*

PFD - do inglês *Pore-Form Domain*

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PIP2 - do inglês *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PIT - do inglês *pore-induced trap*

PKCδ - do inglês, *Protein kinase C δ*

PKR - do inglês, *protein kinase R*

PM - Do inglês, *peritoneal macrophage*

PrgI - proteína agulha do T3SS de *S. typhimurium* fusionada a LFn

PRR - do inglês, *Pattern Recognition Receptors*

PtdIns4P - do inglês, *phosphatidylinositol 4-phosphate*

PYD - do inglês, *PYRIN domain*

RAGE - do inglês, *receptor for advanced glycation end products*)

RE - retículo endoplasmático

ROS - do inglês, *reactive oxygen species*

ROSmt - ROS mitocondrial

RPMI-1640 - meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute – 1640*

SD - do inglês, *standard deviation*

SFB - soro fetal bovino

SPF - do inglês, *specific-pathogen free*

SYK - do inglês, *Spleen tyrosine kinase*

T3SS - do inglês *type III secretion system*

T4SS - do inglês *type IV secretion system*

TGN - do inglês *trans-Golgi network*

TGNd - TGN dispersa

Th - do inglês, *T helper*

TIR - do inglês, *Toll-interleukin 1 Receptor*

TLR - do inglês, *Toll-like receptor*

TNF - do inglês *tumor necrosis factor*

TNFR - do inglês, *TNF receptor*

U - unidade

VRAC - do inglês, *volume-regulated anion channels*

VX-765 - (S)-1-((S)-2-[[1-(4-amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino]-3,3-dimethylbutanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide

WT - do inglês, *Wild-type*

µg - micrograma

µM - micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Receptores de reconhecimento de padrões do sistema Imune inato.....	25
1.2	Inflamassomas canônicos	28
1.2.1	Inflamassoma formado por NLRP3.....	29
1.2.1.1	<i>Alterações no fluxo iônico.....</i>	30
1.2.1.1.1	Efluxo de potássio (K ⁺).....	30
1.2.1.1.2	Efluxo de Cloro (Cl ⁻).....	31
1.2.1.1.3	Mobilização de cálcio (Ca ²⁺).....	32
1.2.1.2	<i>Disfunção mitocondrial</i>	33
1.2.1.3	<i>Rede trans-Golgi</i>	34
1.2.1.2	<i>Ruptura do lisossomo.....</i>	34
1.2.2	Inflamassomas formados por NLRC4	37
1.3.	Mecanismos efetores mediados por inflamassomas	46
1.3.1	Mecanismos canônicos: piroptose e secreção de IL-1β e IL-18	46
1.3.2	Secreção de DAMPs.....	49
1.3.2.1	<i>HMGB1.....</i>	49
1.3.2.2	<i>IL-1α.....</i>	51
1.4	Justificativa	53
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivo central.....	56
2.1.2	Objetivos específicos.....	56
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1	Animais.....	58
3.2	Obtenção de macrófagos peritoneais.....	58
3.3	Obtenção de células derivadas da medula óssea	59
3.4	Obtenção de macrófagos derivados de monócitos humanos.....	60
3.5	Tratamento com LPS e inibidores.....	61
3.6	Estimulação com agonistas de inflamassomas.....	62
3.7	Detecção de citocinas por ELISA e HTRF	63
3.8	Imunofluorescência para avaliação da formação de <i>speck</i> de ASC	63
3.9	Detecção de atividade de caspase-1.....	64
3.10	Análise de viabilidade celular.....	64
3.11	WB para detecção de HMGB1, IL-1β e caspase-1 bioativas	65

3.12 Representação gráfica e análises estatísticas.....	65
4 RESULTADOS.....	67
4.1 A flagelina purificada de <i>S. typhimurium</i> , tanto em sua forma livre como inserida em vesículas lipídicas, é capaz de ativar inflamassoma em PMs e BMDMs.....	68
4.2 A flagelina purificada de <i>S. typhimurium</i> induz liberação de DAMPs.....	71
4.3 A ativação do inflamassoma em resposta à flagelina é dependente de NLRP4 e parcialmente dependente de NLRP3 em PMs.	72
4.4 Ativação do inflamassoma em resposta à flagelina é regulada por catepsinas lisossomais e ocorre independente de fagocitose.	73
4.5 A IL-1 β induzida por flagelina não é regulada por catepsinas em macrófagos primários humanos.	76
4.6 A deleção simultânea das catepsinas B, C e S reduz a liberação de IL-1 β	77
4.7 A mobilização de Ca ²⁺ de estoques lisossomais contribui para regular a secreção de IL-1 β	79
4.8 Catepsinas lisossomais modulam a produção de IL-1 β em resposta à flagelina independentemente da ativação de NLRP3.	80
4.9 Catepsinas participam da clivagem de IL-1 β , mas não são requeridas para induzir a formação de specks de ASC e nem a maturação de caspase-1.	82
5 DISCUSSÃO	86
6 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE	111

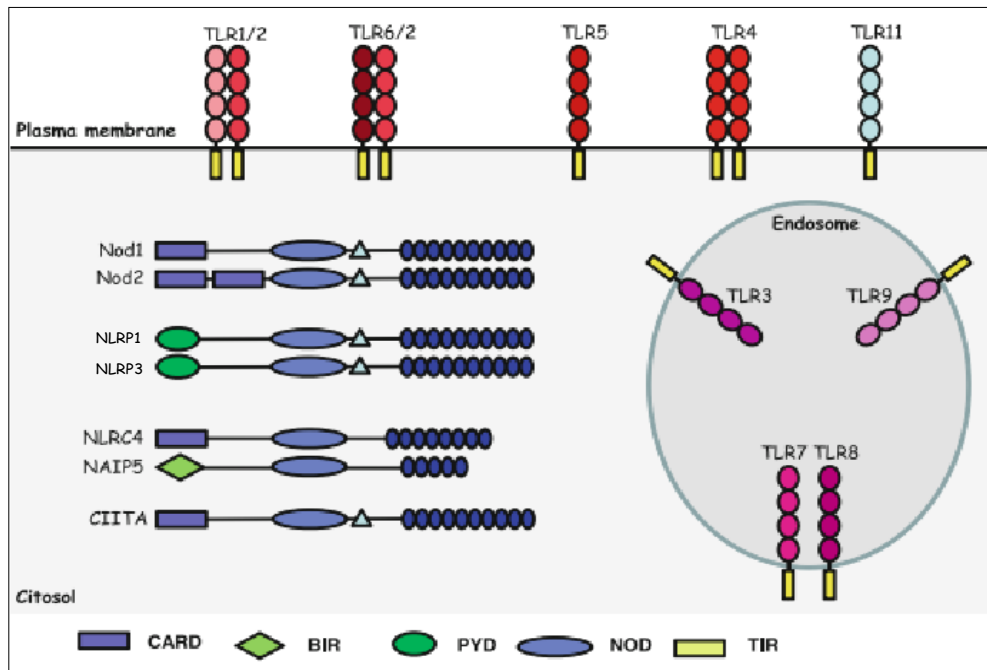
1.1 Receptores de reconhecimento de padrões do sistema Imune inato

O sistema imune é um sistema de reconhecimento que atua por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas e é responsável por manter ou restabelecer a homeostasia do organismo frente a situações de infecções e alterações celulares. Esse sistema pode ser dividido no compartimento inato e adaptativo. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo e representa uma resposta rápida e estereotipada a patógenos e a danos celulares realizada pelo engajamento de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) codificados na linhagem germinativa. Já a imunidade adaptativa ocorre em fases mais tardias e é caracterizada pela especificidade e pela geração de células antígeno específicas¹.

Os PRRs são responsáveis por detectar a presença de microrganismos e células alteradas pelo reconhecimento de estruturas conservadas em patógenos e moléculas endógenas liberadas por células danificadas chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *Damage Associated Molecular Patterns*), respectivamente. Os PRRs são expressos em células profissionais do compartimento inato, como macrófagos e células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*), e também por células não imunes, como células epiteliais, hepáticas e fibroblastos². O engajamento dos PRRs leva à ativação de cascatas de sinalização que estão envolvidas na geração da resposta imunidade adaptativa e da inflamação para o controle e eliminação do patógeno, assim como para promover a reparação e regeneração tecidual^{2,3}.

Esses receptores encontram-se na superfície das células, dispersos no citoplasma, em compartimentos intracelulares ou secretados na circulação sanguínea e fluídos teciduais. Dentre os PRRs merecem destaque os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-Like Receptors*), presentes em membranas plasmáticas e endossomais, e os receptores citoplasmáticos NLRs (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain [NOD], Leucine Rich Repeats [LRR]-containing protein*) (Figura 1).

Figura 1 – Localização celular dos receptores TLR e NLR

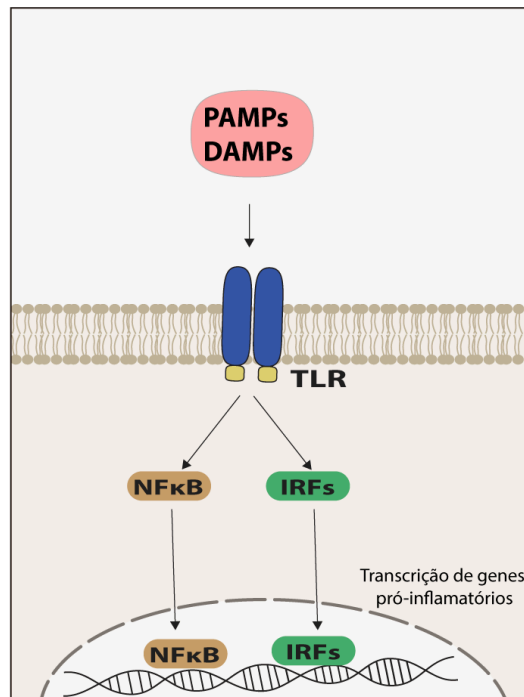


Os receptores TLR encontram-se associados a membranas e os receptores NLRs estão dispersos no citoplasma. Fonte: adaptado de Bortoluci e Medzhitov, 2010⁴.

Os TLRs são proteínas transmembrânicas do tipo I que contêm um domínio N-terminal externo à membrana rico em repetições de leucina (LRRs), que é responsável pelo reconhecimento dos PAMPs e DAMPs; um domínio transmembrânico e uma porção C-terminal citosólica semelhante ao domínio intracelular do receptor para a interleucina (IL)-1 (TIR, do inglês *Toll-interleukin 1 Receptor*), que é requerida para a transdução de sinal (Figura 1). Os TLRs possuem distintos ligantes, entre eles: lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias gram-negativas (ligante de TLR4), flagelina, subunidade monomérica do flagelo de bactérias (ligante de TLR5 e TLR11) e seqüências de DNA ricas em CpG não metilados, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9)^{5,6}.

O engajamento dos TLRs por seus ligantes culmina na ativação de quinases e fatores de transcrição, como o *nuclear fator-κB* (NF-κB) e *Interferon (INF) responsive factors* (IRFs). Desse modo, o reconhecimento dos PAMPs por TLRs gera uma variedade de respostas biológicas, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, IFN-I e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) que formarão redes de sinalização para conduzir eficientemente as respostas imunes inata e adaptativa⁷ (Figura 2).

Figura 2 – A ativação de TLRs leva à transcrição de genes inflamatórios



A ativação de TLRs em resposta à PAMPs e DAMPs gera a transcrição de genes pró-inflamatórios mediada por fatores de transcrição como NF- κ B e IRFs. Fonte: autoria própria.

Os NLRs constituem o maior grupo de receptores citoplasmáticos. Essa família compreende as proteínas NOD, *NLR Pyrin (PYD) domain containing (NLRP)*, *neuronal apoptosis inhibitor factors (NAIP)*, *apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1)* e *NLR CARD (caspase recruitment domain) Domain Containing (NLRC)*, entre outras⁸. Essas proteínas são formadas por três domínios: uma porção C-terminal com sequências LRR; um domínio efetor N-terminal variável que podem ser do tipo PYD, CARD ou *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat (BIR)* e um domínio central do tipo NOD ou *nucleotide binding-domain (NBD)*⁹ (Figura 1). O domínio LRR mantém os receptores em uma conformação fechada e parece exercer um efeito auto-inibitório em situações homeostáticas^{10,11}. Acredita-se que, após a mudança conformacional da proteína induzida por estímulos citosólicos, o próximo passo para a ativação do receptor NLR seja a oligomerização do domínio NBD, formando uma plataforma de sinalização ativa, permitindo a ligação de moléculas adaptadoras e proteínas efetoras, culminando em uma resposta inflamatória^{9,12}.

1.2 Inflamassomas canônicos

As proteínas NLR NLRP1, NLRP3 e NLRC4 e também as proteínas não-NLR AIM2 (do inglês, *absent in melanoma 2*) e Pypin são relacionadas pela capacidade de formar complexos multiproteicos denominados inflamassomas^{13,14}. Essas maquinarias celulares são formadas pela proteína sensora, pela molécula adaptadora *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) e pela forma inativa da cisteíno-protease caspase-1 (pró-caspase-1) (Figura 3A).

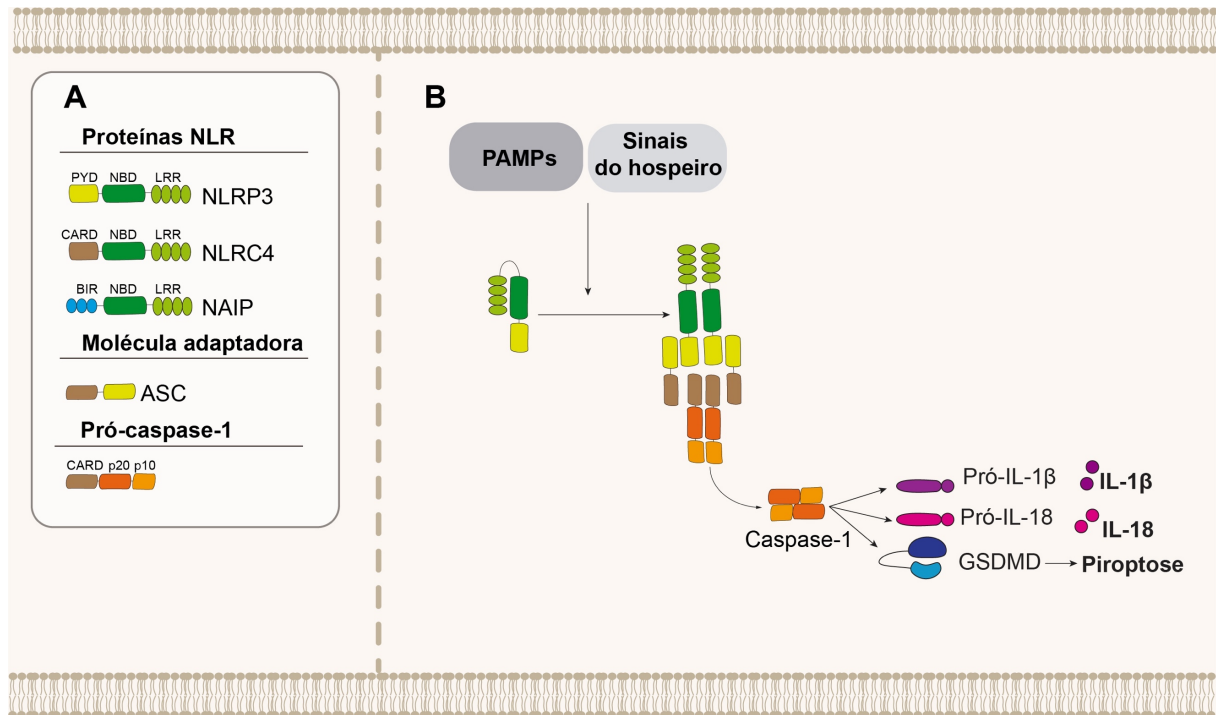
O reconhecimento de sinais derivados de patógenos ou do hospedeiro levam à ativação e oligomerização da proteína sensora e ao subsequente recrutamento de ASC por interações homotípicas. A molécula de ASC é composta pelos domínios PYD e CARD e as proteínas sensoras que possuem o domínio N-terminal do tipo PYD recrutam ASC através de interações homotípicas PYD-PYD, ao passo que as proteínas que possuem o domínio N-terminal do tipo CARD recrutam ASC através de interações CARD-CARD¹⁴ (Figura 3B).

Análises de crio-microscopia eletrônica (Cryo-EM, do inglês *cryogenic electron microscopy*) e ressonância magnética de sólidos (*solid-state nuclear magnetic resonance*) indicam que as moléculas de ASC agregam seus domínios PYD em grandes filamentos helicoidais denominados *specks*, expondo os domínios CARD, que servirão para o recrutamento da pró-caspase-1^{15,16}. Em seguida, a pró-caspase-1 rapidamente se auto-processa em sua forma enzimaticamente ativa, que está envolvida com diversos processos celulares¹⁷. Dentre esses, destacam-se o processamento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, membros da família IL-1, e a indução de morte celular por piroptose¹⁸ (Figura 3B). Em suas formas maduras, a IL-1 β e IL-18 tornam-se biologicamente ativas e são liberadas para o meio extracelular. A piroptose é induzida através da maturação de proteínas citosólicas pertencentes a família das gasderminas (GSDM), em especial a GSDMD¹⁹⁻²². Esses processos celulares serão abordados em maiores detalhes na sessão 1.3.1.

Os inflamassomas são objeto de intensa investigação nas últimas décadas devido ao seu papel no controle de infecções e também por seu papel deletério em doenças não transmissíveis. Apesar da infinidade de estudos já realizados, os mecanismos moleculares responsáveis pela ativação dessas maquinarias e o papel dessas em diversas patologias ainda não estão completamente estabelecidos. Até o

momento, os inflamassomas melhor caracterizados e os alvos do presente estudo são os formados pelas proteínas NLRP3 e NLRC4.

Figura 3 – Inflamassomas canônicos



(A) Proteínas que compõem os inflamassomas canônicos NLRP3 e NAIP/NLRC4 e seus respectivos domínios. **(B)** A presença de PAMPs ou de sinais derivados do hospedeiro no citoplasma faz com que a proteína sensora sofra uma mudança conformacional, permitindo o recrutamento da pró-caspase-1 via ASC, por interações homotípicas entre os domínios das proteínas. A caspase-1 ativa medeia o processamento da pró-IL-1 β , pró-IL-18 e da GSDMD, levando à morte celular por piroptose. Fonte: autoria própria.

1.2.1 Inflamassoma formado por NLRP3

O inflamassoma formado por NLRP3 é o mais estudado e foi primeiramente associado com síndromes autoinflamatórias denominadas CAPS (do inglês, *Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome*) em que mutações de ganho de função levam à ativação excessiva desse inflamassoma com secreção exacerbada de IL-1 β ²³⁻²⁶. Posteriormente, foi descrito que esse inflamassoma também contribui para a patogênese de doenças comuns não transmissíveis, como diabetes, Alzheimer e artrite reumatoide²⁷. O envolvimento de NLRP3 no controle de infecções causada por diversos patógenos também já foi reportada em diversos estudos, como revisto por Tartey e Kanneganti²⁸.

O NLRP3 responde a uma variedade de sinais que levam à perda de sua auto-inibição. Os estímulos capazes de ativar esse inflamassoma são de natureza distinta e não relacionados, incluindo RNA viral, toxinas formadoras de poros, substâncias particuladas e sinais derivados do hospedeiro^{27,29}. A ampla diversidade de gatilhos capazes de ativar esse receptor sugere que esses agentes alterem fatores derivados do hospedeiro que por fim levam à ativação do inflamassoma, posicionando o NLRP3 como ponto central de monitoramento da homeostase celular.

O mecanismo de ativação de NLRP3 é complexo e é composto por pelo menos dois passos (Figura 4). O primeiro sinal, ou *priming*, é provido pelo engajamento de PRRs, como TLRs e NOD2, ou de receptores de citocinas pró-inflamatórias como receptores de fator de necrose (TNFR, do inglês, *TNF receptor*) e IL-1R. Essas vias culminam na ativação de NF-κB e possivelmente de outros fatores de transcrição, que por sua vez induzem a expressão de *NLRP3*, *IL-1β* e *IL-18* (Figura 4). O primeiro sinal também regula positivamente o NLRP3 a nível pós-translacional. Nessa etapa, o NLRP3 pode sofrer deubiquitinação e fosforilação, facilitando a formação desse inflamassoma²⁹⁻³². A segunda etapa da ativação de NLRP3 resulta na oligomerização do sensor e recrutamento de ASC e caspase-1 em resposta aos distintos agonistas¹⁴ (Figura 4). Apesar da infinidade de estudos, ainda não foi estabelecido um mecanismo molecular unificado responsável pela formação desse inflamassoma. Diversos modelos para elucidar a ativação de NLRP3, que não são mutualmente exclusivos, foram propostos:

1.2.1.1 Alterações no fluxo iônico

1.2.1.1.1 Efluxo de potássio (K⁺)

A mobilização de K⁺ é um dos mecanismos de ativação propostos melhor aceitos, uma vez que a liberação de IL-1β por macrófagos tratados com a maioria dos agonistas de NLRP3, incluindo ATP, nigericina, cristais e RNA citosólico de dupla fita (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*) é acompanhada pela diminuição da concentração intracelular de K⁺ ³³⁻³⁹ (Figura 4). Não obstante, a inibição do efluxo de K⁺ por uma alta concentração de K⁺ extracelular têm sido utilizada como estratégia para bloquear a ativação de NLRP3 em resposta a diversos agonistas^{17,35,39} e apenas a redução do níveis de K⁺ parece ser suficiente para ativar o inflamassoma³⁵.

Os agonistas de NLRP3 induzem a mobilização de K^+ de maneiras distintas. A estimulação com ATP induz a abertura do receptor purinérgico P2X7, permitindo o efluxo de K^+ , que é contrabalanceado pelo influxo de íons de Cálcio (Ca^{2+})⁴⁰. Já toxinas formadoras de poro, como estreptolisina O, danificam a membrana plasmática da célula levando ao transporte de K^+ diretamente pela membrana. Ainda, a ativação do inflamassoma não-canônico, formado pela caspase-11 murina (ortóloga das caspases 4 e 5 humanas) leva à ativação não-convencional de NLRP3, presumidamente pela formação de poros na membrana, com o consequente fluxo de íons⁴¹.

Apesar da importância do efluxo de K^+ para a ativação de NLRP3 em resposta à maioria dos agonistas, não existem evidências que o balanço intracelular de K^+ module a resposta desse sensor diretamente. Não obstante, acredita-se que esse seja um ponto de convergência desencadeado pelos diferentes estímulos necessário para a interação entre NLRP3 com a quinase *never in mitosis gene a [NIMA]-related kinase 7* (NEK7), que controla a oligomerização e a consequente ativação de NLRP3⁴²⁻⁴⁴. A interação entre NEK7/NLRP3 requer efluxo de K^+ uma vez que esta interação é abolida na presença de uma elevada concentração extracelular de K^+ que impede o fluxo desse íon.

Embora o efluxo de K^+ intracelular seja suficiente para ativar NLRP3, esse parece não ser um mecanismo exclusivo e estritamente necessário. Estudos mais recentes demonstram que NLRP3 pode ser ativado em resposta a agonistas de maneira dependente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) por vias independentes da mobilização de K^+ (descrito em maiores detalhes na sessão 1.2.1.3)^{45,46}. Ademais, a ativação do inflamassoma murino NLRP1b em resposta à toxina letal (LT, do inglês *lethal toxin*) do anthrax de *Bacillus anthracis* requer o efluxo de K^+ , indicando que esse mecanismo não é exclusivo para a ativação de NLRP3⁴⁷.

1.2.1.1.2 Efluxo de Cloro (Cl^-)

Além do efluxo de K^+ , já foi descrito que o efluxo de Cl^- participa da ativação de NLRP3. Em células estimuladas com ATP, a diminuição da concentração de Cl^- extracelular pode levar ao efluxo de Cl^- intracelular, contribuindo para a produção das

formas ativas de caspase-1 e IL-1 β ⁴⁸ (Figura 4). Ainda, anti-inflamatórios não-esteroides que inibem os canais aniônicos regulados por volume (VRAC, do inglês *volume-regulated anion channels*) podem inibir a ativação de NLRP3, mas não dos inflamassomas formados por NLRC4 e AIM2^{37,49,50}. O efluxo de Cl⁻ dependente do canal intracelular de cloreto (CLIC, do inglês *chloride intracellular channel*) pode promover interação NEK7/NLRP3 e subsequente oligomerização de ASC⁴⁹. Esses dados vão de encontro a estudos publicados anteriormente que demonstram que a nigericina não causa alterações na concentração intracelular de Cl⁻³⁵. O mecanismo pelo qual Cl⁻ medeia a interação entre NEK7/NLRP3 bem como a relação entre efluxo de Cl⁻ e K⁺ ainda precisam ser elucidados.

1.2.1.1.3 Mobilização de cálcio (Ca²⁺)

A mobilização de Ca²⁺ controla diversos processos celulares, incluindo proliferação e diferenciação, transcrição e morte celular⁵¹. Diversos ativadores de NLRP3 induzem um rápido influxo de Ca²⁺ do meio extracelular ou de reservatórios celulares, como o retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi^{52,53}. Já foi demonstrado que a inibição farmacológica da mobilização de Ca²⁺ diminuiu a ativação do inflamassoma NLRP3, mas não teve efeito sobre a ativação dos inflamassomas NLRC4 e AIM2^{52,54}. O engajamento do receptor sensor de Ca²⁺ (CASR, do inglês *Ca²⁺ sensing receptor*) aumenta os níveis intracelulares de Ca²⁺, e reduz os níveis de AMP cíclico (AMPc, monofosfato cíclico de adenosina), liberando o NLRP3 da inibição promovida pelo AMPc⁵⁴.

Apesar das evidências que sugerem que a mobilização de Ca²⁺ participa da regulação de NLRP3, o seu papel ainda é controverso. Primeiramente porque o Ca²⁺ tem um importante papel como segundo mensageiro e está envolvido em diversos processos celulares, como mitose e apoptose, e é extremamente difícil distinguir se o Ca²⁺ está diretamente modulando a ativação de NLRP3 ou modula esse inflamassoma indiretamente através de sua atuação em outros processos celulares^{31,51}. De fato, recentemente foi demonstrado que o fluxo de Ca²⁺ decorrente da estimulação com agonistas de NLRP3, associado a despolarização da membrana plasmática aumentam a atividade da calpaína, uma cisteíno protease citoplasmática. A calpaína, por sua vez, liberta os estoques de caspase-1 que estão presos ao citoesqueleto, permitindo a formação do inflamassoma. No entanto, a inibição da atividade basal de

calpaína também afetou a ativação dos inflamassomas AIM2 e NLRC4, indicando que o eixo alteração do potencial de membrana/ Ca^{2+} /calpaína contribui para a ativação dos inflamassomas de maneira ampla, e não somente restrita à NLRP3⁵⁵.

Além disso, o complexo de Golgi, os lisossomos e as mitocôndrias que representam importantes estoques de Ca^{2+} intracelulares³⁸ também estão relacionados a outras vias de ativação propostas para o NLRP3, sendo extremamente difícil estabelecer se a mobilização de Ca^{2+} é apenas uma consequência ao estresse gerado nessas organelas que por fim culminam na ativação de NLRP3 ou se é o mecanismo direto para a ativação desse receptor (Figura 4). Finalmente, outros estudos demonstram que a inibição da ativação de NLRP3 promovida pelo fármaco BAPTA é independente de sua função de quelante de Ca^{2+} , confrontando as evidências do papel de Ca^{2+} para a ativação de NLRP3^{38,56}.

1.2.1.2 *Disfunção mitocondrial*

A atividade mitocondrial vem sendo associada a ativação de NLRP3 por diferentes mecanismos (Figura 4). Zhou e colaboradores, mostraram que o sensor NLRP3 colocaliza com mitocôndrias no espaço perinuclear após a ativação do inflamassoma⁵⁷ e a ativação eficiente de NLRP3 depende do arranjo espacial das mitocôndrias coordenada pelos microtúbulos⁵⁸. Diversos agonistas de NLRP3 induzem a produção de ROS mitocondrial (ROSmt) e o tratamento com antioxidantes parece inibir a produção de IL-1 β dependente de NLRP3. No entanto, os mecanismos pelos quais NLRP3 é sensibilizado pela produção de ROSmt ainda são controversos.

Em macrófagos murinos e humanos que apresentam fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase (NADPH, do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) defeituosa que falham em produzir ROS apresentam ativação normal de NLRP3⁵⁹, sugerindo que o ROS não é o mecanismo exclusivo para a ativação de NLRP3. A geração de ROS é geralmente acompanhada por um efluxo de K^+ , sendo possível que a baixa concentração de K^+ intracelular leve a geração de ROS e vice e versa⁵³. Por fim, a geração de ROSmt parece ser detectada por NEK7 e não por NLRP3 diretamente⁴⁴.

Durante a ativação do inflamassoma ou apoptose, mitocôndrias disfuncionais podem liberar o DNAm oxidado para o citosol e, na presença de um estímulo anterior, acarretar na produção de IL-1 β ⁶⁰. Recentemente, foi demonstrado que o primeiro sinal

necessário para aumentar a expressão dos componentes do inflamassoma também inicia a síntese de DNAm_t induzida pelo fator de transcrição IRF1⁶¹. O segundo sinal provido pelos agonistas de NLRP3 geram disfunção mitocondrial, oxidação do DNAm_t por ROS_mt e na subsequente liberação de DNAm_t oxidado que se liga ao NLRP3, levando a sua ativação (Figura 4). Contudo, existem dados controversos na literatura sobre a participação da disfunção mitocondrial na ativação do inflamassoma. Estudos anteriores sugerem que a disfunção mitocondrial ocorreria após a ativação de caspase-1⁶² e *downstream* a ativação de NLRP3⁶³, indicando que esse não seria o sinal unificador necessário e exclusivo para a ativação de NLRP3.

1.2.1.3 Rede *trans*-Golgi

Em um estudo recente foi sugerido que agonistas que são capazes de induzir a ativação de NLRP3 de maneira dependente e independente do efluxo de K⁺ intracelular levam à desestabilização da rede *trans*-Golgi (TGN, do inglês *trans-Golgi network*) em estruturas que formam a TGN dispersa (TGNd). Em seguida, a sequência polibásica de NLRP3 medeia sua ligação com Fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns4P, do inglês *phosphatidylinositol 4-phosphate*) presente no TGNd, que serve como uma plataforma para a agregação de NLRP3 e ASC, permitindo a formação da cascata de sinalização *downstream* (Figura 4). No entanto, somente o recrutamento de NLRP3 para TGNd não foi suficiente para induzir a ativação desse receptor, indicando que a presença do agonista de NLRP3 é fundamental para sua ativação⁶⁴. Como esse modelo é extremamente novo, outros estudos são necessários para confirmar essa teoria. Além disso, nesse trabalho não foi verificado se a estimulação com agonistas particulados de NLRP3 também é capaz de induzir a desestabilização da TGN.

1.2.1.2 Ruptura do lisossomo

Um dos mecanismos pelos quais cristais podem induzir inflamação é através da ativação de NLRP3. Cristais patológicos como os de ácido úrico produzidos na gota⁶⁵, de β-amilóide expressos na doença de Alzheimer⁶⁶ e cristais de colesterol⁶⁷, bem como materiais particulados inorgânicos presentes no ambiente como a sílica⁵⁹, são capazes de gerar dano lisossomal levando ao extravasamento do conteúdo dessa organela para o citoplasma⁶⁸. Os lisossomos foram primeiro apelidados como “bolsas suicidas” por Christian Duve devido ao grande número de

hidrolases que estão contidas nessa organela responsáveis pela degradação de proteínas, lipídios e ácidos nucléicos⁶⁹. No entanto, hoje sabe-se que o lisossomo está envolvido em diversos processos fisiológicos além da degradação de componentes celulares e representa um importante ponto de controle metabólico⁷⁰.

O mecanismo pelo qual o dano lisossomal pode ativar NLRP3 ainda é debatido. Dentre os mecanismos propostos, figuram a mobilização de Ca^{2+} ³⁸ e a produção de ROS^{71,72} gerados após o dano lisossomal e o extravasamento da cisteína cathepsina B no citoplasma e detecção pelo NLRP3⁶⁸ (Figura 4).

As cisteína cathepsinas pertencem à superfamília de enzimas semelhantes a papaína. Essas proteases foram primeiramente relacionadas aos processos de reciclagem de proteínas e da apresentação endossomal de antígenos, mas hoje sabe-se que essas proteases desempenham um papel chave em uma infinidade de processos biológicos⁷³. Já foi descrito o envolvimento de cisteína cathepsinas em processos de morte celular, regulação do ciclo celular, autofagia e degradação de alvos extracelulares. A localização extra lisossomal das cathepsinas é comumente associada com condições patológicas e a uma ampla gama de doenças como artrite reumatoide, câncer e a processos infecciosos⁷⁴.

Assim como a caspase-1, as cisteína cathepsinas são sintetizadas com zimógenos inativos e precisam ser processadas para poder desempenhar sua função proteolítica integralmente. A clivagem pode ser realizada por outras proteases ou removida pela própria cathepsina em pH baixos⁷³. O pH levemente ácido do lisossomo favorece o funcionamento dessas proteases, ao passo que o pH neutro fisiológico (7,4) promove a desnaturação dessas proteínas, representando um mecanismo de regulação das cathepsinas⁷⁵. No microambiente tumoral, o pH levemente ácido decorrente do alto metabolismo da glicose, facilita a liberação e a atividade pericelular da cathepsina B^{76,77}. Contudo, outros estudos já demonstraram que as cathepsinas B, D e L possuem atividade enzimática residual mesmo no pH neutro do citoplasma^{78,79}.

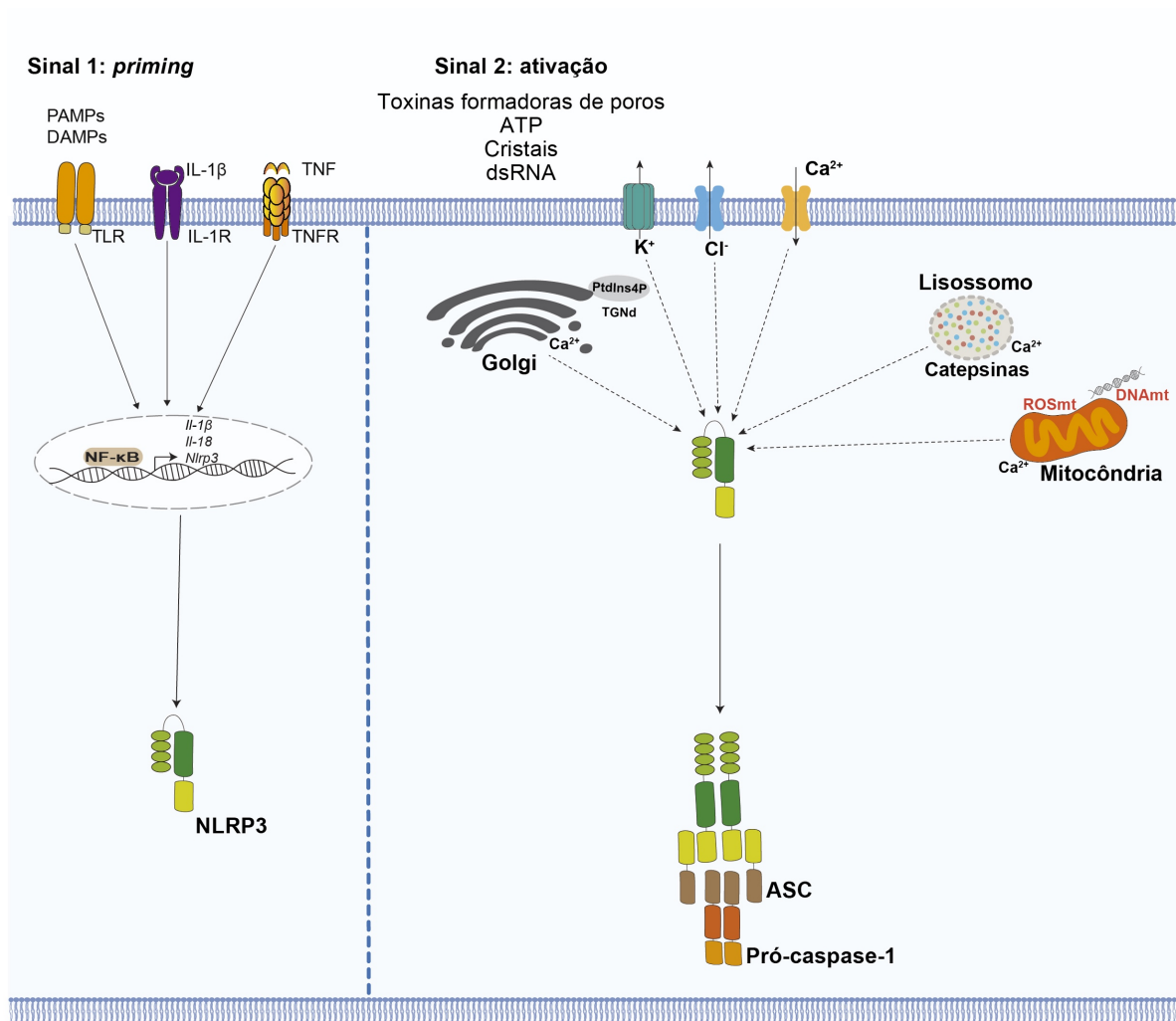
A cathepsina B foi a primeira a ser proposta como responsável pela ativação de NLRP3 devido a estudos que mostraram que a inibição farmacológica dessa protease promovida pelo Ca-074Me foi capaz de reduzir a produção de IL-1 β em resposta a agonistas particulados⁸⁰. No entanto, estudos posteriores demonstraram que as concentrações de Ca-074Me que são capazes de inibir a cathepsina B também inibem as cathepsinas C, L, S e Z⁸⁰⁻⁸². Ainda, uma vez que as cathepsinas tem papéis redundantes, é extremamente difícil estabelecer o papel exato e

exclusivo de cada uma dessas proteases. A deleção simultânea de algumas catepsinas gera animais inviáveis, impedindo a confirmação genética de papéis possivelmente desempenhados por essas proteases^{80,82}. Ademais, estudos mais recentes sugerem que essas proteases atuam na fase efetora do inflamassoma e também na fase de *priming*, uma vez que o tratamento com diferentes inibidores e o *knockdown* simultâneo das catepsinas B, C, S, X e L foi capaz de reduzir a transcrição de pró-IL-1 β ⁸².

Outros estudos sugerem que as catepsinas participam da ativação do inflamassoma NLRP1b em camundongos em resposta à LT. O tratamento de macrófagos com LT, levou à liberação de catepsina B para o citoplasma e o tratamento com o Ca-074Me foi capaz de bloquear a morte celular induzida pela LT e também inibir a clivagem de caspase-1 e IL-1 β ^{83,84}, indicando que as catepsinas não modulam exclusivamente as respostas de NLRP3.

A fosforilação de ASC em diversos resíduos mediadas pelas quinases *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), *Spleen tyrosine kinase* (SYK) e *c-Jun N-terminal kinases* (JNK), bem como a redistribuição de monômeros de ASC para a região perinuclear mediada por SYK e JNK facilitam a formação de *specks* de ASC e conseqüentemente para a formação do inflamassoma⁸⁵. A ativação de JNK ocorre após a ruptura do lisossomo em resposta a agonistas da NLRP3⁸⁶, sugerindo que esse é um outro mecanismo pelo qual o dano lisossomal contribui para a ativação de NLRP3. No entanto, ainda não foi estabelecido se a JNK é ativada após a ruptura lisossomal somente em resposta a ativadores de NLRP3 ou se isso ocorre também em resposta a agonistas de outros inflamassomas. Por fim, em células da glia a catepsina B parece ser requerida para induzir a ativação da pró-caspase-1 diretamente, levando a secreção de IL-1 β e IL-18, sugerindo que esse pode ser outro mecanismo pelo qual as catepsinas modulam a secreção dessas citocinas de maneira independente de NLRP3^{87,88}.

Figura 4 – Mecanismos propostos para ativação de NLRP3



O sinal 1 (*priming*, à esquerda) é fornecido pela ativação de PRRs em resposta a PAMPs ou DAMPs ou pelo engajamento de receptores de citocina, como TNFR e IL-1R e leva à transcrição de *Nlrp3*, *Il-1 β* e *Il-18*. O sinal 2 (à direita) é fornecido pelos agonistas de NLRP3 que induzem alterações na homeostase celular, como efluxo de K⁺ e de Cl⁻, influxo de Ca²⁺, produção de ROSmt, liberação de DNAm oxidado, formação da TGNd e ruptura lisossomal. O distúrbio celular gerado pelo sinal 2 gera uma alteração conformacional de NLRP3, levando à oligomerização desse sensor e ao recrutamento de ASC e de pró-caspase-1. Fonte: autoria própria.

1.2.2 Inflamassomas formados por NLRC4

Os inflamassomas formados por pelas proteínas NAIP e NLRC4 têm um importante papel no controle de infecções bacterianas, a exemplo de *Salmonella typhimurim*, *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri* e *Burkholderia thailandensis*⁸⁹. Inicialmente, foi proposto que NLRC4 seria ativado pela presença da flagelina, no citoplasma celular^{90,91}. Importante, a flagelina também é reconhecida pelo receptor transmembrânico TLR5, mas a ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4 acontece independentemente da ativação do TLR. Ainda, a porção da flagelina reconhecida por

NAIP/NLRC4 encontra-se no domínio D0 da molécula, ao passo que TLR5 reconhece uma porção presente no domínio D1⁹²⁻⁹⁴. Posteriormente, foi demonstrado que componentes do sistema de secreção do tipo III (T3SS, do inglês *type III secretion system*) e do tipo IV (T4SS) presentes em bactérias virulentas também eram capazes de induzir a ativação de NLRC4 mesmo na ausência da flagelina^{92,93,95,96}. Com efeito, esses dados sugeriam que a ativação de NLRC4 em resposta a componentes bacterianos poderia ser mais complexa.

Primeiramente, foi proposto que as proteínas NLRC4 e NAIP5 formariam dois inflamassomas distintos em resposta à flagelina citosólica^{91,97}. No entanto, posteriormente elegantes estudos concomitantes dos grupos de pesquisa liderados por Russell Vance e Feng Shao forneceram evidências bioquímicas de que as proteínas NAIP são as sensoras dos componentes bacterianos e formam complexos com NLRC4, levando a oligomerização dessa proteína e consequente formação do inflamassoma NAIP/NLRC4^{92,93}.

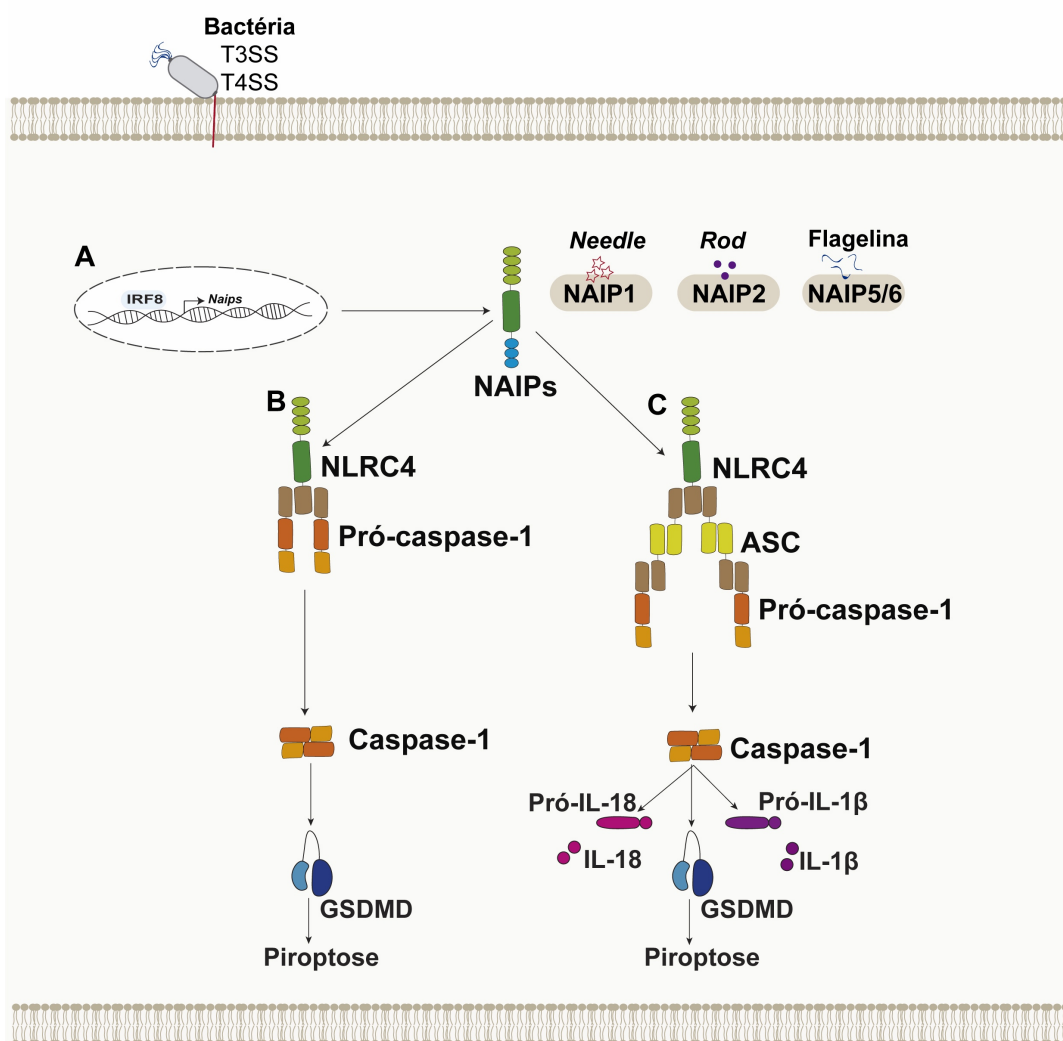
Em 2016, novamente os grupos de Vance e Shao publicaram estudos provendo evidência genética da especificidade dos diferentes NAIPs^{95,96}. Em camundongos, os receptores NAIP1 e NAIP2 reconhecem as proteínas do tipo *needle* (agulha) e proteínas do tipo *rod*, respectivamente, presentes nos aparatos T3SS/T4SS, enquanto NAIP5 e NAIP6 reconhecem a flagelina^{92,93,95,96,98}. No entanto, humanos expressam apenas um NAIP funcional que reconhece proteínas do tipo agulha do T3SS e a flagelina^{99,100}, ainda que haja controversa se a mesma isoforma de NAIP é capaz de reconhecer a proteína do tipo agulha e a flagelina e levar a a ativação do inflamassoma⁹⁹. Em conjunto, os dados indicam que as proteínas NAIP funcionam como sensores das proteínas bacterianas e o NLRC4 atua como uma plataforma para ativação de caspases¹⁰¹ (Figura 5).

O inflamassoma NAIP/NLRC4 diferencia-se do NLRP3 devido à habilidade das proteínas NAIP em interagir fisicamente com ligantes proteicos e também pelo requerimento de duas proteínas NLR para a formação desse complexo¹⁰¹. Devido à extensa investigação conduzida sobre ativação de NAIP/NLRC4 em células murinas, que incluem estudos de biologia estrutural, os mecanismos requeridos para a formação de NAIP/NLRC4 são os melhor caracterizados.

Assim como descrito para NLRP3, o primeiro sinal que induz a expressão de NAIP e NLRC4 e modificações pós-transcricionais também participa da ativação desse inflamassoma¹⁰². Estímulos pró-inflamatórios, como TNF- α , induzem um

aumento na expressão de *NLRC4*. No entanto, células do sistema imune e epiteliais já possuem expressão basal de *NLRC4*, o que permite a formação do inflamassoma em resposta à infecção por bactérias patogênicas^{102–104}. Em camundongos, IRF8 medeia a transcrição das proteínas NAIP, contribuindo para a ótima ativação do inflamassoma NAIP/*NLRC4*, indicando que a expressão dessas moléculas é um dos mecanismos envolvidos na regulação desse inflamassoma¹⁰⁵ (Figura 5).

Figura 5 – Ativação dos inflamassomas formados por NAIP/*NLRC4*

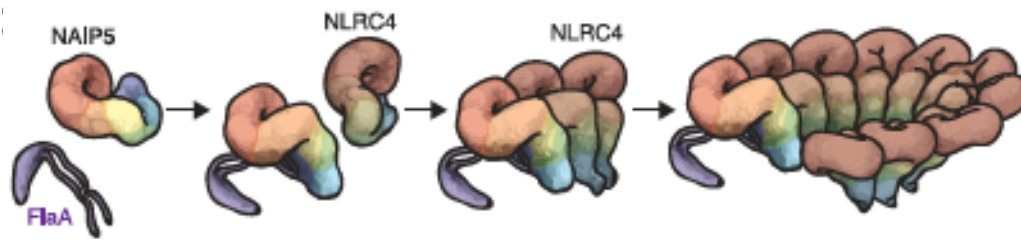


O fator de transcrição IRF8 induz a transcrição dos sensores *Naips*, otimizando a ativação do inflamassoma NAIP/*NLRC4*. **(A)** Os NAIPs reconhecem e interagem fisicamente com os ligantes cognatos dos componentes bacterianos de T3SS/T4SS e com a flagelina. Essa interação induz uma alteração conformacional em NAIP, que permite o recrutamento e oligomerização de *NLRC4* que pode recrutar a pró-caspase-1 diretamente, levando à morte celular por piroptose **(B)**, ou através da molécula adaptadora ASC, induzindo a piroptose e a secreção de IL-1β e IL-18 **(C)**. Fonte: autoria própria.

O NLRC4 é classificado como uma ATPase e, portanto, requer a ligação de uma molécula de ATP para mediar a sinalização inflamatória. Durante o seu estado inativo, o NLRC4 permanece ligado à uma molécula de ADP¹⁰. A expressão de NLRC4 mutantes sem o domínio CARD e a posterior análise cristalográfica permitiu identificar que o domínio LRR interage com o domínio NOD dessa proteína. As interações entre esses domínios, bem como a interação com o ADP, permitem a estabilização da estrutura monomérica do NLRC4 em uma conformação fechada¹⁰. Mutações próximas ao sítio de ligação de ADP alteram a estrutura de NLRC4, favorecendo a formação espontânea de oligômeros de NLRC4 e ativação exacerbada do inflamassoma¹⁰⁶. De fato, mutações de ganho de função de NLRC4 associadas a doenças autoinflamatórias se agrupam perto do sítio de ligação de ADP. Ainda, proteínas mutantes de NLRC4 que não são capazes de se ligar ao ATP também são incapazes de ativar a caspase-1, sugerindo que essa é uma região crucial para a regulação da ativação de NLRC4¹⁰².

Estudos posteriores permitiram elucidar como ocorre a interação entre NAIP e seus ligantes cognatos, bem como NAIP interage com NLRC4^{93,107-111}. Dois estudos independentes demonstraram através da utilização de cryo-EM que uma única molécula PrJ (componente do T3SS) derivada de *S. typhimurium* é capaz de ativar uma única molécula de NAIP2 e iniciar sua oligomerização com aproximadamente 10 moléculas de NLRC4 na conformação aberta^{108,109}. Um terceiro estudo baseado em cryo-EM descreveu a estrutura do complexo formado pela flagelina-NAIP5-NLRC4¹¹¹. Nesse trabalho, reconstruções em três dimensões (3D) demonstraram que o complexo contém apenas uma molécula de NAIP5 ligada a uma molécula de flagelina, como havia sido sugerido anteriormente por Halff e colaboradores¹¹⁰ e também em consonância com o modelo proposto para NAIP2/NLRC4^{108,109}. Essas reconstruções sugerem que o NAIP5 interage com NLRC4 através de uma superfície “doadora”. A superfície “receptora” em NLRC4 se liga a região doadora de NAIP5, e também medeia a ligação de NLRC4 a outra molécula de NLRC4 vizinha. No entanto, a região receptora das moléculas de NLRC4 posteriormente recrutadas para o complexo não é capaz de recrutar outra molécula de NAIP5, impossibilitando o fechamento da estrutura em formato de anel¹¹¹ (Figura 6).

Figura 6 – Modelo de formação do inflamassoma NAIP5/NLRC4



O domínio D0 da flagelina (roxo) se liga à NAIP5, induzindo a sua abertura. A mudança conformacional induzida pela interação com o ligante leva ao recrutamento e ativação do NLRC4. O NLRC4 ativo recruta mais protômeros de NLRC4, promovendo a auto-propagação da oligomerização e a formação de uma plataforma para ativação de caspase-1. Fonte: Tenthorey et al., 2017¹¹¹.

Previamente foi sugerido que a interação da flagelina com NAIP5 era dependente de três resíduos de leucina na porção C-terminal da flagelina⁹⁴, demonstrado através da utilização de construções proteicas feitas com os 35 aminoácidos finais da porção C-terminal. Entretanto, Halff e colaboradores, através da utilização da flagelina inteira, demonstraram que os resíduos de leucina não parecem ser essenciais para o reconhecimento da flagelina. Mesmo após a substituição dos três resíduos de leucina por três resíduos de alanina os complexos foram formados, contudo em menor quantidade do que os complexos formados com a flagelina selvagem. Além disso, a porção N-terminal também foi capaz de gerar a formação de inflamassomas¹¹⁰. De fato, os dados de *cryo-EM* indicam que o NAIP5 realiza numerosos contatos com os domínios N e C terminais da flagelina, ainda que o domínio C-terminal seja requerido para a interação entre o domínio N-terminal e NAIP5. Além disso, mutações nos domínios BIR, LRR e NBD de NAIP5 diminuíram a capacidade dessa proteína em interagir com a flagelina. O domínio BIR foi capaz de interagir com a porção C-terminal desse ligante, sendo esse o primeiro trabalho a sugerir uma função para o domínio BIR¹¹¹.

Assim como demonstrado para a flagelina, diferentes porções da PrgJ, componente do T3SS, também interagem com NAIP2¹¹¹. Mutações pontuais na flagelina ou na PrgJ não foram capazes de romper a interação desses ligantes com as proteínas NAIP. A interação entre os ligantes-receptores só foi abolida quando múltiplas mutações, que perturbam as funções das proteínas bacterianas foram realizadas. Com efeito, o reconhecimento de múltiplas superfícies parece ser uma estratégia comum utilizada pelo hospedeiro para controlar os patógenos, uma vez que

mutações drásticas levam à perda de função dessas proteínas, com um alto custo para a sobrevivência do patógeno¹¹¹.

A formação do complexo ligante-NAIP-NLRC4 leva à exposição do domínio CARD de NLRC4, que serve como uma plataforma para o recrutamento de caspases. Essas proteases podem ser recrutadas diretamente por interações homotípicas CARD-CARD ou através de ASC (Figura 5). Os inflamassomas que são formados independente de ASC favorecem a indução da piroptose, com baixos níveis de secreção de IL-1 β e IL-18, ao passo que aqueles que são formados com ASC levam à morte celular por piroptose, mas também à secreção robusta dessas citocinas inflamatórias (Figura 5)¹¹².

Além da habilidade da flagelina em ativar o inflamassoma NAIP/NLRC4, levando à piroptose e secreção de IL-1 β , essa também é capaz de induzir outras vias citosólicas pós-translacionais que contribuem para a ativação do inflamassoma. Foi demonstrado que a flagelina induz a fosforilação da serina 533 (S533) de NLRC4, um passo importante para a ativação de NAIP5/NLRC4^{113,114}. Essa fosforilação ocorre de maneira independente do reconhecimento da flagelina por NAIP5, uma vez que antecede esse evento¹¹⁵. Macrófagos deficientes para a proteína quinase δ (PKC δ , do inglês *protein kinase δ*), responsável por fosforilar NLRC4, apresentaram menor indução de piroptose e secreção de IL-1 β ¹¹³. Posteriormente, foi descrito que a quinase LRRK2 (LRRK2, do inglês [*LRR*] *kinase 2*) forma um complexo com NLRC4 e também é capaz de fosforilar a S533¹¹⁴. Embora a expressão reduzida de PKC δ ou LRRK2 acarrete na ativação defeituosa de NAIP/NLRC4 essa ocorre mesmo que em menor grau ou tardiamente, sugerindo que existem mecanismos acessórios e redundantes para a liberação de NLRC4 do estado de auto-inibição e ativação otimizada do inflamassoma NAIP/NLRC4¹¹⁴.

Qu e colaboradores demonstraram que células que expressam o mutante S533A, que não é fosforilado, apresentam um defeito leve na clivagem de caspase-1 em comparação às células com NLRC4 selvagem, gerando a produção tardia de IL-1 β em resposta à infecção com *S. typhimurium* ou a flagelina citosólica. No entanto, macrófagos deficientes para NLRP3 apresentaram uma redução mais drástica nos níveis de IL-1 β produzidos do que os com o NLRC4S533A. Além disso, foi sugerido que NLRP3 é recrutado para o complexo via NLRC4/ASC, amplificando o processamento da caspase-1 e liberação de IL-1 β ¹¹⁶. Esses dados vão de acordo com estudos prévios, em que foi descrito que a interação entre NLRP3 e NLRC4 era

importante para o controle da *Salmonella*. Em resposta a esse patógeno, ambas proteínas NLRs são requeridas para clivar a caspase-1 e montar uma resposta robusta frente à infecção¹¹⁶⁻¹²⁰. As proteínas NLRP3 e NLRC4 parecem estar presentes na mesma plataforma, ainda que a possível interação física entre essas moléculas necessita ser elucidada¹²⁰.

Além das modificações pós-translacionais e a interação com o NLRP3 que regulam a ativação dos inflamassomas NAIP/NLRC4, nosso grupo descreveu que a estimulação de macrófagos com flagelina citosólica da bactéria gram positiva *Bacillus subtilis*, desencadeia uma via lisossomal que contribui para a produção de IL-1 β dependente de NLRC4¹²¹. No entanto, o mecanismo pelo qual o lisossomo contribui para modular as respostas do inflamassoma NAIP/NLRC4 não foi estabelecido. As evidências do envolvimento de diversas vias e interação entre os diferentes NLRs para o ótimo funcionamento de NAIP/NLRC4 em resposta a componentes bacterianos evidenciam como as respostas mediadas por esse inflamassoma são finamente controladas, evitando respostas inflamatórias exacerbadas.

Apesar de estar consolidado que inflamassomas que contêm NLRC4 sejam formados após o reconhecimento de proteínas bacterianas no citosol, há um crescente número de evidências que indicam que NLRC4 também participa da resposta a estímulos não bacterianos e a insultos estéreis. A primeira evidência do envolvimento de NLRC4 em outros contextos foi a sua participação juntamente com NLRP3 no controle do fungo *Candida albicans*¹²². A secreção de IL-1 β dependente de NLRC4 foi promovida por células da mucosa gastrointestinal de maneira independente da expressão desse receptor por células do compartimento hematopoiético, demonstrando a importância da expressão de componentes do inflamassoma por células não imunes. Com efeito, diversos trabalhos vêm demonstrando a importância da expressão de NLRC4 no trato gastrointestinal para o controle de patógenos entéricos e manutenção de uma microbiota saudável¹⁰². Além disso, as mutações de ganho de função que estão associadas a doenças autoinflamatórias em humanos ocasionam comprometimento da mucosa intestinal resultantes da inflamação exacerbada nesse compartimento^{123,124}. Contudo, no contexto de infecção não bacteriana o ligante responsável pela ativação de NLRC4 é desconhecido.

Em contextos estéreis, diversos trabalhos sugerem que a inflamação exacerbada decorrente da ativação de NLRC4 tem um papel deletério. Na

hiperalgesia inflamatória aguda induzida por carragena, as moléculas NLRC4 e ASC, mas não NLRP3, são necessárias para a ativação periférica de caspase-1 e secreção de IL-1 β ¹²⁵. Nesse estudo, argumenta-se que NLRC4 é ativado por estímulos endógenos, uma vez que nenhum estímulo infeccioso foi utilizado e que os queratinócitos possivelmente são os responsáveis pela produção de IL-1 β . Nesse sentido, também foi reportado que sinais endógenos levam à ativação de NLRC4 na inflamação induzida pela hiperosmolaridade¹²⁶. A manutenção da osmolaridade tecidual é um processo importante para a homeostasia do organismo e o estresse causado pela hiperosmolaridade foi capaz de induzir a ativação de caspase-1 e liberação de IL-1 β por macrófagos. Nesse estudo, foi descrito que a geração de ROSmt parece ser uma via comum para ativar os inflamassomas NLRP3 e NLRC4, indicando que o NLRC4 está envolvido no monitoramento de sinais derivados do hospedeiro, ainda que não tenha sido elucidado se NLRP3 e NLRC4 colocalizam-se em uma única estrutura ou se formam dois complexos diferentes¹²⁶.

A ativação de NLRC4 também parece estar envolvida com a detecção de DAMPs na inflamação cerebral estéril. AIM2 e NLRC4 contribuem com a molécula adaptadora ASC, de maneira independente de NLRP3, na gênese da lesão cerebral aguda estéril no derrame cerebral¹²⁷. Posteriormente, também foi demonstrado que em astrócitos e micróglia obtidos de camundongos tratados com o agente desmielinizante cuprizona, bem como em tecidos obtidos de cérebro de pacientes com esclerose múltipla, há um aumento significativo da expressão de *NLRC4*¹²⁸. Nesse estudo, Freeman e colaboradores demonstraram que o DAMP cerebral lisofosfatidilcolina ativa o inflamassoma de maneira dependente de NLRP3 e NLRC4. Esses dados sugerem que a ativação desses receptores contribuem para neuropatologias desmielinizantes, como o Alzheimer e esclerose múltipla¹²⁸.

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama e está associada a um pior prognóstico e a um microambiente tumoral desfavorável¹²⁹. Em camundongos obesos, o microambiente tumoral recrutou macrófagos com NLRC4 ativado que levaram à secreção de IL-1 β , que contribuiu para a progressão da doença. Ainda, amostras de mama de doadoras obesas apresentaram maior expressão de NLRC4 que as amostras controles. No entanto, o estímulo que acarretou maior expressão de NLRC4 e a ativação desse inflamassoma não foi estabelecido. É possível que alterações na microbiota de obesas contribua para favorecer a ativação de NLRC4 e agravar o progresso do câncer de mama¹³⁰.

A inflamação crônica de menor grau tem sido associada ao envelhecimento, aumentando o risco de doença cardiovascular, câncer e doenças degenerativas. Modelos animais sugerem que ocorre uma maior ativação dos inflamassomas com o envelhecimento¹³¹. Recentemente, Furman e colaboradores demonstraram que a maior ativação de inflamassoma e secreção de IL-1 β estão relacionadas a um maior risco de desenvolver hipertensão associada à idade¹³². Nesse estudo, foi demonstrado que indivíduos que possuem maior expressão de *NLRC4* e *IL1B* tinham uma maior probabilidade de apresentar doenças cardiovasculares. Curiosamente, também foi sugerido que o consumo de café contribui para diminuir a inflamação no processo de envelhecimento¹³². Ensaios *in vitro* com a linhagem celular monocítica THP-1 indicam que a cafeína foi capaz de inibir a secreção IL-1 β mediada por NLRC4 em resposta aos metabólitos derivados de nucleotídeos Adeninas e N4-acetilcitosinas na presença de ATP. Ainda, esses metabólitos foram capazes de aumentar a expressão de RNA mensageiro de *NLRC4* e *IL1B* em monócitos primários humanos¹³². No entanto, o mecanismo pelo qual esses metabólitos ativam o NLRC4 e como a cafeína é capaz de inibir a ativação de NLRC4 ainda precisam ser esclarecidos¹³².

A participação de NLRC4 na progressão de câncer ligado a obesidade e a associação dessa molécula em doenças relacionadas ao envelhecimento demonstram que existe uma forte e intrigante relação entre metabolismo, ativação de inflamassoma e doenças crônicas que merece ser melhor compreendida para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratar essas patologias. Por fim, nenhum dos estudos que demonstrou o envolvimento de NLRC4 em contextos não bacterianos abordou o possível papel de NAIP e como o NLRC4 é ativado por sinais derivados do hospedeiro. Novos estudos serão necessários para esclarecer se o NLRC4 interage com outra proteína e funciona como uma plataforma para ativação de caspases, de maneira semelhante ao descrito para o inflamassoma NAIP/NLRC4 ou se nesses contextos outros sinais são capazes de liberar o NLRC4 do estado de auto-inibição, bem como os mecanismos responsáveis pela ativação de NLRC4 em resposta aos sinais endógenos. Ainda, nos estudos que reportam a cooperação entre NLRC4 e os sensores AIM2 e NLRP3 não foi estabelecido se essas proteínas formam um único inflamassoma, se dois complexos são formados na mesma célula ou se esses sensores são ativados em diferentes células¹³³.

1.3. Mecanismos efetores mediados por inflamassomas

1.3.1 Mecanismos canônicos: piroptose e secreção de IL-1 β e IL-18

Nos últimos anos, os mecanismos moleculares responsáveis pela indução de piroptose vem sendo revelados. A caspase-1 ativa proteoliticamente a GSDMD, que é composta por um domínio C-terminal, responsável pela auto-inibição da proteína, e um domínio N-terminal efetor, também denominado domínio formador de poro (PFD, do inglês *Pore-Form Domain*)¹³⁴ ligados por um longo *loop*^{135,136}. A caspase-1 cliva um resíduo de aspartato dentro da alça de ligação, liberando o fragmento PFD, que oligomeriza-se e associa-se com lipídios na membrana interna da célula^{135,136} para formar poros de 10-33 nm¹³⁷⁻¹⁴¹, levando ao inchaço celular e eventualmente à morte celular lítica por piroptose (Figura 7)^{135,136}. Até a descoberta da GSDMD como a molécula efetora da piroptose, a função fisiológica das proteínas GSDM era praticamente desconhecida. No entanto, o domínio PFD é altamente conservado entre vários membros da família GSDM e a expressão do domínio PFD das proteínas GSDMA, GSDMA3, GSDMB, GSDMC e GSMDE em células da linhagem HEK293 foi capaz de induzir a formação de poros e conseqüentemente a morte celular necrótica¹³⁷.

A piroptose é caracterizada pela rápida formação de poros na membrana plasmática e dano ao DNA, resultando na lise celular e na liberação passiva do conteúdo intracelular pró-inflamatório¹⁴². A formação dos poros dissipa o gradiente celular iônico, mas retém grande quantidade de constituintes citoplasmáticos, aumentando a pressão osmótica que por fim culmina na lise da célula¹⁴².

Por resultar na perda do nicho de replicação microbiana, a piroptose é considerada um mecanismo efetor importante para o controle de infecções^{143,144}. Além disso, a indução da piroptose em células infectadas com bactérias patogênicas resulta na liberação do conteúdo intracelular, gerando um microambiente inflamatório, e na formação de redes denominadas PITs (do inglês, *Pore-Induced Traps*) que retém as bactérias intracelulares, tornando-as mais susceptíveis a agentes microbicidas, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), eferocitose por neutrófilos^{145,146} e possivelmente ao próprio PFD, que pode levar à lise da membrana celular bacteriana¹⁴⁷.

As citocinas da família IL-1 não possuem peptídeo sinal que direcionam as proteínas ao RE e posteriormente ao seu destino final, e por isso a secreção dessas

proteínas é denominada não convencional¹⁴⁸. Um dos mecanismos propostos para a liberação de IL-1 é através da liberação passiva decorrente da morte celular, majoritariamente através da piroptose¹⁴⁹ (Figura 7). Certamente, a descoberta da GSDMD como substrato das caspases inflamatórias ampliou o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos para a liberação dessa citocina¹⁵⁰.

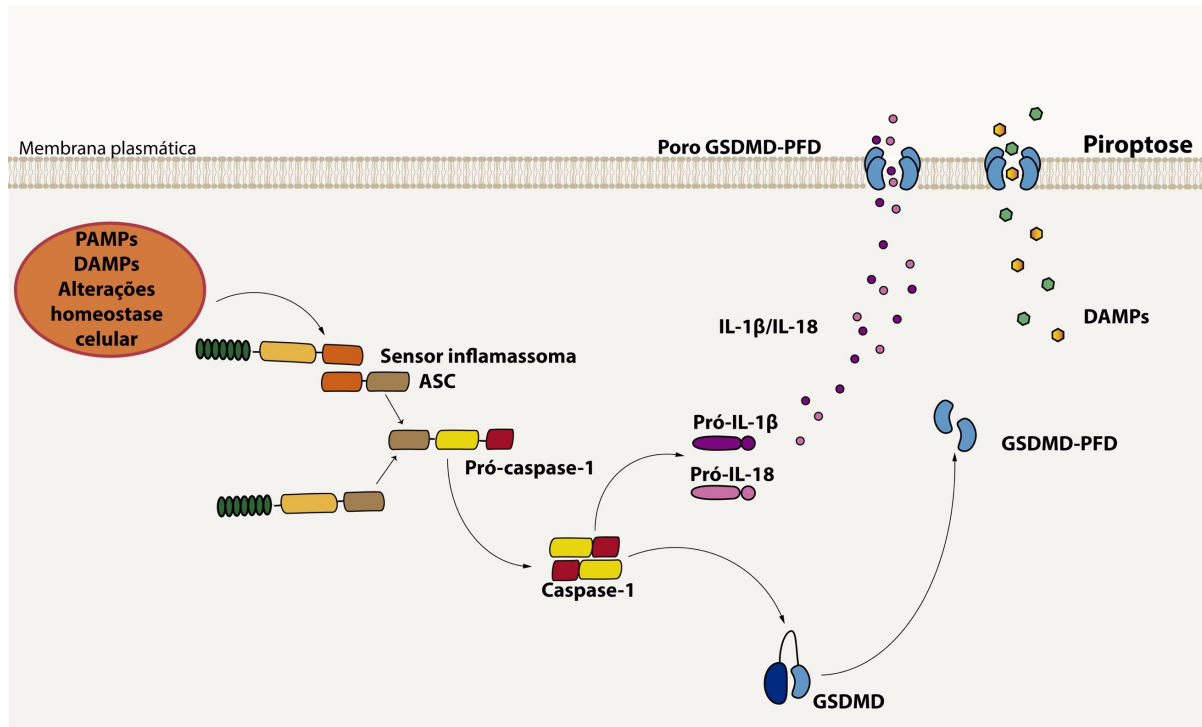
O diâmetro do poro formado na membrana pelo PFD possui cerca de 10-33 nm, sendo suficiente para permitir a passagem de IL-1 β e IL-18, que possuem 4 nm de diâmetro¹³⁷⁻¹⁴¹. No entanto, esse poro não permite a passagem da enzima lactato desidrogenase (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*), que é utilizada como um indicativo da perda de integridade da membrana plasmática e morte necrótica^{151,152}. Células viáveis capazes de secretar IL-1 foram denominadas hiperativadas¹⁵³ e nessas células a IL-1 é transportada ativamente pelos poros de GSDMD^{154,155}, sem que haja o rompimento da membrana plasmática, como havia sido proposto inicialmente por Finkson e Cookson¹⁵⁶. Esses dados indicam que a liberação de IL-1 é regulada por GSDMs, independentemente do rompimento da célula e liberação do conteúdo intracelular¹⁵¹ (Figura 7). Com efeito, a ação da GSDMD no transporte ativo da IL-1 β para o meio extracelular pode explicar estudos prévios que descreveram a liberação de IL-1 β por células viáveis^{153,157}.

A IL-1 β é considerada um fator endógeno pirogênico por sua capacidade de atuar no hipotálamo e induzir a produção de prostanglandina E₂ (PGE₂) e febre¹⁵⁸. No final dos anos 1970, foi demonstrado que a IL-1 β possuía múltiplas atividades além da indução da febre. Essa citocina é um dos mais potentes mediadores solúveis, devido a sua capacidade de orquestrar processos imunológicos, metabólicos e fisiológicos e, conseqüentemente, está envolvida tanto no controle de infecções como na gênese e agravamento de doenças inflamatórias estéreis¹⁵⁹.

Esse mediador é produzido principalmente por células do sistema imune inato, sendo os macrófagos, monócitos, DCs e neutrófilos as principais fontes de IL-1 β ¹⁵⁸. Na região da lesão tecidual e infecção, a IL-1 β induz a migração de leucócitos, promove a vasodilatação e a expressão de PGE₂. A sinalização dessa citocina ocorre através do engajamento do IL1R, que por fim culmina na transcrição de genes mediada pelos fatores de transcrição NF- κ B, MAPK, JNK e *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). A atuação da IL-1 β em células do compartimento inato acarreta na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF e na liberação de

óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), um importante agente microbicida, e PGE₂ por macrófagos, monócitos inflamatórios e neutrófilos¹⁵⁸.

Figura 7 – A ativação do inflamassoma induz a morte celular por piroptose



Os inflamassomas canônicos são ativados em resposta a PAMPs, DAMPs e alterações citoplasmáticas e levam à ativação da caspase-1. A caspase-1 ativa induz o processamento da GSDMD e a porção N-terminal (PFD) interage com lipídios na membrana plasmática, levando à formação de poros na membrana e eventual ruptura por lise osmótica, levando à morte celular por piroptose, com extravasamento do conteúdo intracelular, DAMPs e IL-1β/IL-18. Em células viáveis, a IL-1β e provavelmente a IL-18 são ativamente transportadas pelo poro gerado pelo GSDMD-PFD em resposta à ativação do inflamassoma. Adaptado de Amante-Mendes et al¹⁶⁰.

A IL-1β também tem um importante papel na modulação do sistema imune adaptativo, uma vez que direciona e ativa o perfil *T helper* (Th)17 de linfócitos TCD4⁺¹⁵⁹. Esse subtipo celular está envolvido frequentemente com o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide, sendo esse um dos mecanismos pelos quais a sinalização de IL-1β pode ser deletéria¹⁵⁹. Ainda, na presença de IL-23, a IL-1β contribui para a geração de células linfóides inatas (ILCs, do inglês *innate lymphoid cells*) do tipo 3, que produzem IL-17 e IL-23¹⁵⁸.

Apesar da IL-18 pertencer a mesma família que a IL-1β e ter o processamento e secreção também mediados pelos inflamassomas, os seus mecanismos de ação são distintos. A sinalização da IL-18 ocorre através do engajamento do receptor de IL-18 (IL-18R, do inglês, *IL-18 receptor*). Essa citocina está envolvida com o

direcionamento de linfócitos TCD4⁺ para o subtipo Th1, que produzem grandes quantidades de interferon γ (IFN- γ)¹⁶¹. Surpreendentemente, a estimulação de DCs esplênicas com flagelina leva à rápida produção de IL-18, que por fim acarreta na produção inata de IFN- γ por células TCD8⁺ de memória, uma vez que essas células são ativadas sem o engajamento do receptor de antígeno específico da célula TCD8⁺¹⁶².

Nos últimos anos, o papel da IL-18 como modulador da microbiota vem ganhado destaque. A secreção dessa citocina em resposta a sinais da microbiota saudável contribui para a manutenção da barreira intestinal e diversidade microbiana, prevenindo a disbiose¹⁶³. Por outro lado, a secreção exacerbada de IL-18 gera inflamação intestinal devido à perda das células calciformes e perda da integridade da barreira intestinal¹⁶³. Além disso, na doença auto-inflamatória decorrente de mutações de ganho-de-função de NLRC4 denominada MAS-NLRC4 (MAS, do inglês *macrophage activation syndrome*) há a ativação exacerbada de macrófagos e rápido estabelecimento de enterocolite acompanhadas de elevado nível sérico crônico de IL-18. O tratamento dessa patologia com bloqueador de IL-18 mostrou-se benéfico, sugerindo que essa citocina é um importante modulador dessa inflamassomopatia¹⁶⁴.

1.3.2 Secreção de DAMPs

A ativação dos inflamassomas, em especial através da indução de piroptose (Figura 7), também contribui para propagar a inflamação através da liberação de DAMPs^{160,165–169}. Dentre esses DAMPs, destacam-se o HMGB1 e a IL-1 α .

1.3.2.1 HMGB1

A proteína *High-Mobility Group Box 1* (HMGB1) é uma proteína nuclear não histônica que se liga ao DNA e está envolvida na regulação dos processos de transcrição, reparo e recombinação¹⁷⁰. Apesar de estar predominantemente localizada no núcleo, o HMGB1 pode ser translocado para o citoplasma e para o meio extracelular em alguns tipos de leucócitos ativados, como macrófagos e DCs. Modificações pós-translacionais, como metilação, acetilação e fosforilação determinam a localização do HMGB1 e também seu potencial inflamatório no meio extracelular^{169,171–174}. Em macrófagos e monócitos ativados, a hiperacetilação do

HMGB1 altera a localização nuclear da proteína levando à migração para o citoplasma e concentração da proteína em vesículas para eventual secreção¹⁷⁵. Outros estudos que demonstram que o HMGB1 pode ser fosforilado¹⁷⁶ ou metilado¹⁷⁷ também sugerem que essas modificações são requeridas para a mobilização do HMGB1 para o citoplasma.

Quando encontra-se no meio extracelular, o HMGB1 pode ter efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios dependendo do tipo de isoforma liberada¹⁷¹. Essa proteína possui cisteínas nas posições 23, 45 e 106 e estado redox e/ou sulfonação desses resíduos determinam as funções mutualmente exclusivas do HMGB1¹⁶⁹. A redução das cisteínas transformam o HMGB1 em um quimioatraente para leucócitos enquanto a ligação dissulfeto entre as cisteínas 23 e 45 o transformam em um mediador pró-inflamatório que induz a liberação de citocinas como TNF- α e IL-1 β por leucócitos recrutados e células imunes residentes. Já a oxidação terminal das cisteínas mediadas por ROSmt liberado durante o estresse celular ou na morte celular por apoptose geram uma isoforma anti-inflamatória¹⁶⁹. Dessa maneira, as modificações pós translacionais governam o efeito do HMGB1 no sistema imune.

O HMGB1 pode ser liberado ativamente como consequência da ativação celular em resposta a PAMPs e mediadores inflamatórios ou passivamente por células danificadas ou durante processos de morte celular necrótica (Figura 7). A liberação de HMGB1 pode ocorrer pela indução da piroptose e a deleção de componentes do inflamassoma foi capaz de afetar significativamente a liberação desse DAMP¹⁶⁵. Durante o choque séptico induzido por LPS, a liberação de HMGB1 mostrou-se dependente do eixo NLRP3/ASC/caspase-1¹⁷⁸ e dependente de NLRC4/caspase-1 em resposta à infecção por *S. typhimurium*¹⁶⁸. Ainda, a proteína quinase dependente de dsRNA (PKR, do inglês *dsRNA-dependent protein kinase*) parece regular a liberação de IL-1 β , IL-18 e HMGB1 decorrente da ativação dos inflamassomas formados por NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2 em resposta aos respectivos agonistas, uma vez que a deleção de PKR diminuiu significativamente a secreção dessas proteínas¹⁶⁸. A PKR regula a hiperacetilação e translocação do HMGB1 para o citoplasma em resposta aos ativadores de inflamassoma^{168,178}. O HMGB1 hiperacetilado tem uma forte característica quimotática^{179,180}.

O HMGB1 extracelular pode se ligar diretamente aos receptores de superfície TLR4 ou ao receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE, do inglês *receptor for advanced glycation end products*) e agir em sinergia com outros

mediadores inflamatórios para induzir a ativação de cascatas de sinalização. A secreção exacerbada de HMGB1 tem efeitos prejudiciais tanto em resposta a infecções como também está associada a doenças agudas e crônicas, como o lúpus eritematoso¹⁸¹. Em modelos animais, o bloqueio da sinalização via HMGB1 se mostrou benéfico nessas doenças inflamatórias, sendo essa uma possível terapia a ser explorada em patologias inflamatórias em humanos¹⁸¹.

1.3.2.2 IL-1 α

A IL-1 α é uma citocina da família da IL-1 que possui atividade biológica tanto na forma precursora (pró-IL-1 α), quanto nas formas clivadas^{182,183}. Assim como o HMGB1, a IL-1 α é uma “citocina de dupla função”: a sua proforma atua como uma reguladora da transcrição gênica enquanto ambas as formas da citocina são capazes de engajar o IL-1R e atuar como um sinal de alarme para iniciar a inflamação em resposta a uma lesão tecidual^{182,183}. A liberação ativa de IL-1 α é dependente de calpaínas, que são responsáveis por clivar essa citocina¹⁸⁴, ao passo que sua proforma é liberada de forma passiva na morte celular necrótica (Figura 7). Contudo, na apoptose, essa citocina é retida no núcleo, prevenindo a inflamação¹⁸². O papel dos inflamassomas para a liberação da IL-1 α é controverso. Foi demonstrado que para alguns agonistas de NLRP3, como ATP e nigericina, há o envolvimento do eixo NLRP3/ASC/caspase-1 para a secreção de IL-1 α . Entretanto, o MSU e a sílica, que também são agonistas de NLRP3, foram capazes de induzir a secreção de IL-1 α de maneira independente do inflamassoma¹⁸⁵. Ainda, a caspase-1 leva ao processamento de IL-1R2, permitindo a clivagem e liberação da IL-1 α mediada por calpaínas¹⁸⁵. Uma vez que a pró-IL-1 α e a pró-IL-1 β são expressas em células hematopoiéticas em resposta aos mesmos estímulos, e a inibição da caspase-1 é utilizada por diversos patógenos como mecanismo de escape do sistema imune, a liberação de IL-1 α de maneira independente dos inflamassomas pode representar um mecanismo alternativo de engajamento do IL-1R¹⁸⁶. Nesse sentido, dados publicados pelo nosso grupo sugerem que após estímulo com a flagelina citosólica ocorre a secreção de IL-1 α de maneira parcialmente dependente de NLRC4 e de catepsina B¹²¹, sugerindo uma via alternativa de secreção de IL-1 α .

Apesar da semelhança entre as citocinas IL-1 α e IL-1 β e a capacidade de engajar o mesmo receptor celular, essas possuem ações não sobrepostas. A IL-1 α

contribui para o controle de patógenos, uma vez que promove a ativação e o recrutamento de células do sistema imune¹⁶⁹. No entanto, assim como visto para a IL-1 β , a secreção exacerbada de IL-1 α é deletéria e está envolvida na gênese ou no agravamento de inflamações estéreis agudas e crônicas. Já foi sugerido que a IL-1 α tem um papel prejudicial no modelo murino de inflamação aguda do cólon, ao passo que a IL-1 β parece ter um efeito protetor na colite induzida¹⁸⁷. Em alguns contextos, como na artrite reumatoide, a IL-1 α parece ser importante para iniciar inflamação, que depois é amplificada pela produção de IL-1 β , indicando que há uma diferença temporal na produção dessas citocinas^{169,188,189}. No entanto, muitos dos estudos realizados utilizaram bloqueadores do IL-1R, como o anankira, bloqueando o efeito de ambas as citocinas, e já foi demonstrado que camundongos deficientes para IL-1 β possuem uma menor produção de IL-1 α ¹⁶⁹, fatos que dificultam o entendimento das funções diferenciais dessas citocinas.

1.3.3 Outros mecanismos efetores mediados por inflamassomas

Além dos mecanismos discutidos acima, outras cascatas de sinalização são geradas após a ativação dos inflamassomas. Esses mecanismos foram especialmente descritos para os inflamassomas formados por NLRC4, e dentre eles podemos destacar a produção de mediadores lipídicos^{190,191}, ativação da caspase-8^{120,192–197} e produção de NO^{198–201}.

A injeção intraperitoneal ou intravenosa da flagelina fusionada a LT (FlaTox) levou à ativação sistêmica do inflamassoma NAIP5/NLRC4 e à rápida produção de mediadores lipídicos eicosanóides, independentemente da produção de IL-1 β e IL-18 e dependente do eixo NAIP5/NLRC4/caspase-1 por macrófagos peritoneais. A “tempestade de eicosanóides” descrita por Von Moltke e colaboradores rapidamente causou a morte dos camundongos em resposta à FlaTox¹⁹⁰. No entanto, a letalidade promovida pela FlaTox pode ser exacerbada em relação à infecção bacteriana *in vivo*, uma vez que uma grande quantidade de flagelina foi entregue rapidamente de maneira sistêmica.

Um estudo posterior do mesmo grupo sugere que a expulsão de células epiteliais do intestino (IECs, do inglês *intestine epithelial cells*) mediada pela ativação de NAIP/NLRC4 é acompanhada pela produção de eicosanóides, morte celular com perda da integridade de membrana e secreção de IL-18. O tratamento com FlaTox de

animais com expressão condicional de NLRC4 restrita a IECs sugere que essas células são responsáveis pela produção local de eicosanoides¹⁹¹. Em contraste, a expressão condicional de NLRC4 por células mielóides não foi capaz de gerar a produção desses mediadores lipídicos. Nesse estudo, foi demonstrado que a caspase-8 pode ser recrutada via ASC para o inflamassoma NAIP/NLRC4 e mediar a expulsão das IECs do epitélio intestinal e também levar a produção de eicosanoides. A atuação da caspase-8 pode funcionar como um mecanismo compensatório quando a caspase-1 encontra-se inibida, representando um importante mecanismo de defesa do hospedeiro¹⁹¹.

Nosso grupo demonstrou que o estímulo com a flagelina citosólica leva à ativação da Óxido Nítrico Sintase 2 (NOS2, do inglês *nitric oxide synthase 2*) dependente do eixo NAIP5/NLRC4/caspase-1 e independente das citocinas IL-1 β e IL-18 e da molécula adaptadora *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88)¹⁹⁸. Importante, a caspase-1 parece exercer uma regulação epigenética da NOS2, por mecanismos que envolvem a clivagem do regulador de cromatina PARP1, permitindo que a cromatina fique acessível nos locais de ligação de NF- κ B ao promotor gênico da *Nos2*²⁰⁰. A consequente produção de NO, até então relacionada somente à via dos TLRs, representa um importante mecanismo de resistência à infecção por *S. typhimurium*²⁰⁰ e *L. pneumophila*¹⁹⁸. O inflamassoma NLRP3 também foi relacionado com a produção de NO em resposta à infecção por *Trypanosoma cruzi*, sendo esse fator relacionado com a susceptibilidade dos animais e células deficientes em NLRP3 à infecção por esse protozoário^{199,201}.

1.4 Justificativa

Devido ao envolvimento dos inflamassomas para o controle de infecções e do seu papel deletério em doenças não transmissíveis, a compreensão dos mecanismos requeridos para a ativação e regulação dessas maquinarias moleculares é de extrema importância.

Como mencionado, nosso grupo de pesquisa descreveu anteriormente que a estimulação de macrófagos com flagelina citosólica proveniente de *B. subtilis* foi capaz de gerar uma via lisossomal que regula a secreção de IL-1 β em resposta a esse agonista¹²¹. No entanto, o mecanismo pelo qual as catepsinas lisossomais são capazes de modular as respostas mediadas pela ativação do inflamassoma não foi estabelecido. Ainda, outros trabalhos da literatura mostram a ativação de NLRC4

mesmo na ausência de seus ligantes clássicos^{122,125–128,130,132}, sugerindo o envolvimento de vias adicionais na regulação desse inflamassoma. Sendo assim, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar como as catepsinas lisossomais e outros distúrbios da homeostasia celular contribuem para modular as respostas do inflamassoma NLRC4.

Visto que há um crescente número de estudos evidenciando o papel deletério de NLRC4 em patologias auto-inflamatórias e também em outras doenças não transmissíveis, a compreensão de como sinais derivados do hospedeiro contribuem para a ativação dessa molécula é relevante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam a modulação dessa proteína.

2.1 Objetivo central

O objetivo central desse trabalho foi avaliar como as catepsinas lisossomais e outros distúrbios da homeostasia celular contribuem para modular as respostas do inflamassoma NAIP5/NLRC4.

2.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as respostas de macrófagos de diferentes origens à flagelina, agonista de NAIP5/NLRC4;
- Verificar o envolvimento de NLRP3 na regulação das respostas à flagelina;
- Verificar o envolvimento de vias citosólicas para a ativação de NLRC4;
- Verificar mecanismos moleculares mediados pelas catepsinas na regulação de NLRC4;

3.1 Animais

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo número 46, folha 18, livro 03) e pela CEUA da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (protocolo número 9515131015).

Camundongos da linhagem C57BL/6 selvagens (WT, do inglês *wild-type*) e nocautes para NLRP3 (*Nlrp3^{-/-}*) e NLRC4 (*Nlrc4^{-/-}*) de 6-10 semanas de idade foram fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP. Todos os animais foram mantidos em microisoladores com livre acesso à água e ração.

Durante o estágio no Instituto de Imunidade Inata (III, do inglês *Innate Immunity Institute*), Universidade de Bonn, Alemanha, os camundongos da linhagem C57BL/6j WT, nocautes para NLRP3 e repórter para ASC (ASCmCitrine) de 6-10 semanas de idade foram fornecidos pelo *Haus für Experimentelle Therapie, Uniklinikum*, Universidade de Bonn. Os animais C57BL/6j também foram comprados da empresa Charles River. Todos os animais foram mantidos em condições *specific pathogen free* (SPF), em microisoladores com livre acesso à água e ração.

As medulas dos animais nocautes para as catepsinas BCS (*BCS^{-/-}*) e os animais WT pareados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Arturo Zychlinsky do Instituto Max Plank, Berlim, Alemanha.

3.2 Obtenção de macrófagos peritoneais

Para obtenção de macrófagos peritoneais (PMs, do inglês *peritoneal macrophages*), os camundongos WT, *Nlrc4^{-/-}* e *Nlrp3^{-/-}* foram inoculados intraperitonealmente com amido de batata “*Starch*” a 1,5% (Sigma-Aldrich Aldrich, St. Louis, MO - EUA) para enriquecimento do peritônio por macrófagos. Após 96 h, os camundongos foram eutanasiados em câmara fechada por inalação de Halotano (Cristália, Itapira, SP, Brasil). Para obtenção de suspensão celular, injetou-se 5 ml de PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) (1 X) estéril e gelado na cavidade peritoneal (Figura 8A). A suspensão de células foi centrifugada a 300 x g por 5 minutos, e ressuspendida com 5 ml meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute – 1640* (RPMI 1640) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) completo, suplementado com 3% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado (LGC, Cotia, SP, Brasil),

2 mM de L-glutamina e 100 U/ml de estreptomicina e penicilina (Thermo Fisher Scientific). Seguiu-se então a contagem das células em câmara de Neubauer, após diluição da suspensão celular a 1:10 em azul de tripan (Sigma-Aldrich). Após a contagem, as células foram semeadas em placas de 96 poços tratada para aderência (Corning, MA, EUA), em 200 µl na densidade de 5×10^5 células/poço em placa de 96 poços para dosagem de citocinas ou 500 µl na densidade de 1×10^6 células/poço em placas de 24 poços (Corning) para *Western Blot* (WB). Para os experimentos de viabilidade celular realizados no Incucyte Zoom, as células foram semeadas em placas de 24 poços em 500 µl na concentração de 5×10^5 células/poço.

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 completo suplementado com 3% de SFB, por 4 h, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, para que a população de macrófagos fosse enriquecida por aderência. Após esse período, as células não aderentes foram retiradas através de lavagens utilizando PBS morno e mantidas em cultura *overnight*.

3.3 Obtenção de células derivadas da medula óssea

Animais WT, *Nlrp3^{-/-}* e *BCS^{-/-}* foram anestesiados com isoflurano e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical. Os fêmures e as tíbias foram removidos e rapidamente desinfetados em etanol 70%. Em seguida, a cavidade medular óssea foi lavada com meio DMEM (Thermo Fischer) puro com o auxílio de seringa de 5 ml e agulha de 24 G para a obtenção das células da medula óssea (BM, do inglês *bone marrow*) (Figura 8B). A suspensão de células foi centrifugada a 500 x g, por 5 minutos. Para a obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs, do inglês *bone-marrow macrophages*), o meio para diferenciação consistiu em DMEM suplementado com penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), 10% de SFB e 20% de meio condicionado da cultura de células da linhagem de fibroblastos L929, como fonte de M-CSF (do inglês, *macrophage colony stimulating factor*) previamente coletado. As células obtidas foram semeadas em frasco de cultura 150 cm² (Corning), em 20 ml de meio para diferenciação, a 37°C e a 5% de CO₂, por 6 dias. Após esse período, as células foram removidas do frasco de cultura com tampão de PBS 5% SFB 2 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e centrifugadas a 500 g x 5 minutos. As células foram semeadas em placas de 96 poços em 100 µl na densidade de

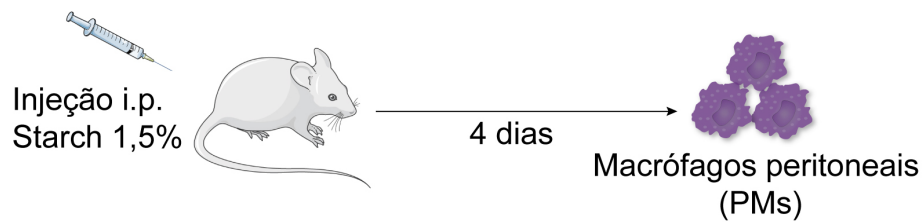
0,8 - 1 x 10⁵ células/poço e cultivadas *overnight* em DMEM completo com 20% de meio condicionado de L929 , a 37°C e a 5% de CO₂.

3.4 Obtenção de macrófagos derivados de monócitos humanos

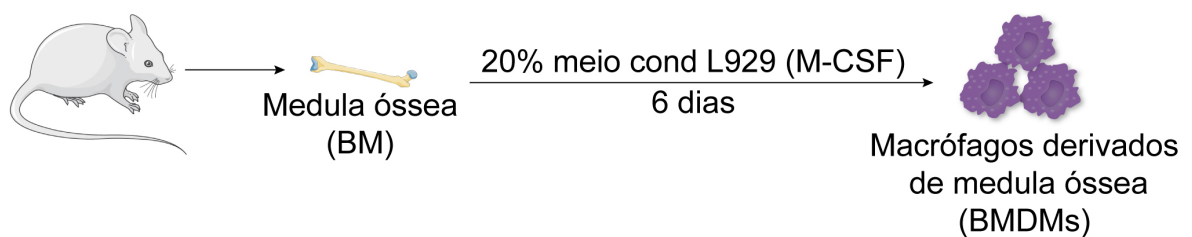
Buffy coats de doadores saudáveis foram obtidas de acordo com protocolos aceitos pelo conselho de revisão institucional da Universidade de Bonn (votos locais de ética Lfd. Nr. 075/14). Os macrófagos derivados de monócitos humanos (hMDMs) foram obtidos através da diferenciação de monócitos CD14⁺ em meio complementado com 500 U/ml de hGM-CSF ou M-CSF recombinantes (ImmunoTools, Friesoythe, Alemanha) e incubados para diferenciação completa em meio RPMI, contendo 10% FBS, hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM e 100U/ml de estreptomicina e penicilina (Thermo Fischer) durante 3 dias (Figura 8C). Em resumo, as PBMC humanas foram obtidas de camadas leucoplaquetárias de doadores saudáveis por centrifugação em gradiente de densidade em Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). Em seguida, as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) foram incubadas a 4°C com microesferas magnéticas conjugadas com anticorpos monoclonais anti-CD14 humano (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Em seguida, os monócitos CD14⁺ foram magneticamente isolados utilizando uma coluna MACS colocada num campo magnético como indicado pelo fabricante (Miltenyi Biotec) e cultivadas para diferenciação.

Figura 8 – Obtenção dos diferentes macrófagos utilizados

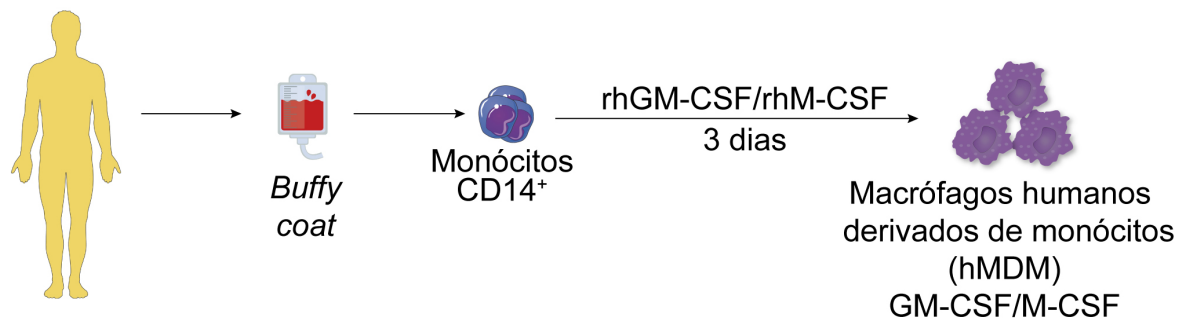
A



B



C



(A) Os macrófagos peritoneais (PMs) foram obtidos 4 dias após a injeção de solução de *Starch* 1,5%. (B) Para obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), as células precursoras foram cultivadas por 6 dias com 20% de meio condicionado de L929 rico em M-CSF. (C) Monócitos humanos CD14⁺ foram isolados a partir de *buffy coats* de doadores saudáveis e cultivados por 3 dias em meio contendo rhGM-CSF ou rhM-CSF para a geração de macrófagos humanos derivados de monócitos (hMDM). Fonte: autoria própria, com utilização de elementos do banco de imagem *SMART Server Medical ART* (<https://smart.servier.com/>), e do *PNG Tree Vectors* (<https://pt.pngtree.com/>) consultados em 27/04/2019.

3.5 Tratamento com LPS e inibidores

Antes da estimulação com os agonistas de inflamassoma, o meio de cultura *overnight* foi descartado e substituído pelo meio OptiMem (Thermo Fischer) livre de SFB. Para induzir a transcrição das proformas dos componentes do inflamassoma, as células foram tratadas com LPS (200 ou 500 ng/ml) (InvivoGen, São Diego, CA, EUA) por 3 h e esse foi mantido em cultura por todo o tempo de estimulação.

Os inibidores E64D (25 μ M) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EUA), Ca-074Me (25 μ M) (Sigma-Aldrich), CAA 0225 (Millipore, Burlington, MA, EUA) foram adicionados 1,5 h antes do *priming* com LPS e mantidos por todo o tempo na cultura. Os inibidores Citocalasina D (5 μ M) (Sigma-Aldrich), BAPTA-AM (100 μ M) (Thermo Fisher), *trans*-NED19 (100 μ M) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EUA) foram adicionado depois do tratamento com LPS e 1,5 h antes do estímulo com os agonistas e o inibidor VX-765 (Selleckchem, Houston, TX, EUA) foi adicionado 10 minutos antes da estimulação com os ativadores de inflamassoma.

O efluxo de K^+ foi inibido através da utilização de meio OptiMem suplementado com 30 mM de KCl durante todo o tempo de estímulo com os ativadores de inflamassoma. Como controle da adição de KCl e para avaliar o papel do efluxo de Cl^- , as células foram cultivadas em meio contendo 30 mM de NaCl durante todo o tempo de estímulo.

3.6 Estimulação com agonistas de inflamassomas

Para entrega no citosol celular, a flagelina de *S. typhimurium* (Invivogen) foi inserida em vesículas lipídicas catiônicas, chamadas DOTAP (*dioleoyl trimethylammonium propane*) (Roche, Basel, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, a flagelina purificada foi adicionada ao DOTAP, na concentração de 1 μ g de flagelina para cada 5 μ l de DOTAP, na presença de HBS (HEPES-salina tamponada). Essa mistura foi homogeneizada por 1 minuto e, então, mantida por 15 minutos em temperatura ambiente para a formação de complexos estáveis gerados espontaneamente. Após esse período, o preparado flagelina/DOTAP foi diretamente adicionado às culturas (1-6 μ g/ml, 1.5-6 h). Dessa maneira, a flagelina foi levada ao citosol celular, como tem sido descrito na literatura^{105,116,121,198}. Como controle, as células também foram estimuladas com a vesícula DOTAP vazia. A flagelina obtida de *S. typhimurium* é capaz de adentrar o citosol celular sem o auxílio do DOTAP e para o estímulo com a flagelina em sua forma livre, adicionou-se a quantidade apropriada de flagelina diretamente as culturas.

Os cristais de ácido úrico (MSU, do inglês *Monosodium Urate Crystals*) (100 μ g/ml, 6 h) (Invivogen), e de sílica (250 μ g/ml, 6 h) foram acrescentados diretamente às culturas. Após a adição dos cristais, a placa de cultura foi centrifugada a 400 x g 5 minutos.

Os plasmídeos codificando as proteínas BsaK de *B. thailandensis* e PrgI de *S. typhimurium* fusionadas ao domínio N-terminal da LT (BsaK-Lfn e PrgI-Lfn, respectivamente) foram gentilmente doados pelo Dr. Feng Shao (*National Institute of Biological Sciences*, Pequim, China) e as proteínas foram purificadas pelo Dr. Mathias Gayer, Dr. Matthew Mangan e David Fußholler (III). A BsaK (100 ng/ml) e a PrgI (500 ng/ml) foram entregues ao citoplasma com o auxílio do antígeno protetor (PA, do inglês *protective antigen*) (List Biologicals, EUA) de anthrax (1 µg/ml). As combinações de PA + BsaK e PA + PrgI foram diretamente adicionadas à cultura por 1,5 h.

3.7 Detecção de citocinas por ELISA e HTRF

A liberação de IL-1 α e IL-1 β para o sobrenadantes das culturas de PMs foi determinada por ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) sandwich de captura utilizando o kit comercial proveniente da empresa BD (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA), da empresa R&D System (Minneapolis, MN, EUA) ou da empresa e-Bioscience (San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções dos fabricantes.

A detecção de IL-1 β e TNF- α nos sobrenadantes das culturas de BMDMs e hMDMs foi determinada por *Homogeneous Time Resolved Fluorescence* (HTRF), utilizando kits comerciais da empresa CisBio (Codolet, França) de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 Imunofluorescência para avaliação da formação de *speck* de ASC

A formação de inflamassomas foi avaliada através da detecção da formação de *specks* de ASC por imunofluorescência. Os BMDMs provenientes de animais ASC mCitrine foram semeados na densidade de $0,8 \times 10^5$ células/poço em 100 µl e cultivados *overnight* em placa de 96 poços de vidro para microscopia (Sigma). Como descrito no item 3.5, os BMDMs foram estimulados na presença do inibidor VX-765 para evitar a perda de *specks* decorrente da indução de piroptose. Após o estímulo, a placa foi centrifugada a 400 x g 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram fixadas com 100 µl de paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS e a placa foi centrifugada (400 x g, 5 minutos) entre as lavagens. Então, os ácidos nucleicos foram corados com 100 µl de PBS contendo 2,5 µM de DRAQ5 (eBioscience).

As imagens foram obtidas usando o microscópio de epifluorescência ZEISS Axio Observer. Z1, com a objetiva de 20X (seca, PlanApochromat, NA 0,8), AxioCam 506 mono e com o auxílio do software *ZEN Blue* (ZEISS, Oberkochen, Alemanha), seguido de análise com o software *Cell profiler* (Harvard e MIT, MA, EUA). Para imagens representativas, foi utilizado um sistema confocal Leica TCS SP5 SMD (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para microscopia de varredura a laser confocal. As imagens foram adquiridas com objetiva 63X, analisadas com o software Fiji (Github).

3.9 Detecção de atividade de caspase-1

A atividade da caspase-1 ativa foi medida por bioluminescência utilizando o kit Caspase-Glo® (Promega, Madison, WI, EUA) conforme as instruções do fabricante. Em resumo, após o estímulo, 50 µl do sobrenadante da cultura foi incubado com o Z-WEHD-aminoluciferina, substrato luminogênico da caspase-1 ativa. Após a clivagem desse substrato pela caspase-1 ativa, o substrato da luciferase (aminoluciferina) é liberado, resultando na reação da luciferase e produção de luz. Após 90 minutos de incubação com o substrato, a luminescência foi registrada.

3.10 Análise de viabilidade celular

A viabilidade celular de PMs foi avaliada utilizando o microscópio Incucyte Zoom (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, EUA). As células (5×10^5 células/poço em placa de 24 poços) foram estimuladas como descrito no item 3.6 em meio contendo 5 µg/ml de brometo de etídio (BrEt) (Sigma) ou 25 nM de *Sytox Green* (Thermo Fisher Scientific). As células que perderam a integridade da membrana, permitiram a difusão de EtBr ou *Sytox Green* para o interior do citosol. A perda da integridade da membrana plasmática é um indicativo de morte celular necrótica, como descrito por Lage e colaboradores²⁰². As imagens foram obtidas em tempo real e analisadas com o software *Incucyte Live Cell Analysis System*.

Após a estimulação de BMDMs, o sobrenadante foi recolhido para a análise de produção de citocinas e a viabilidade das células foi avaliada através do uso do ensaio *Cell Titer Blue* (Promega) conforme as instruções do fabricante. Em resumo, a viabilidade foi avaliada através da capacidade de células viáveis de reduzir o corante resaurina em resofurina. Como controle positivo de viabilidade, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. Como controle negativo, as células foram

tratadas com solução de PBS 0,1% Triton para gerar a lise da célula. As células foram incubadas por 90 minutos a 37 °C com 50 µl de meio contendo resaurina. Após o período de incubação a fluorescência emitida a 560/690 nm foi registrada.

3.11 WB para detecção de HMGB1, IL-1β e caspase-1 bioativas

A secreção de IL-1β (p17) e presença de caspase-1 ativa (p20) foi analisada por SDS-PAGE do sobrenadante seguido de WB com anticorpo específico para IL-1β (R&D System, Minneapolis, MN, EUA), caspase-1 (gentilmente fornecido pelo Dr. Vishva Dixit, Genentech) ou HMGB1 (Abcam, Cambridge, UK). Após os estímulos, os sobrenadantes foram coletados e as proteínas presentes no sobrenadante foram concentradas por precipitação com metanol/clorofórmio como descrito previamente²⁰³ e então ressuspendidas em tampão contendo SDS e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE usando o sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Merck-Millipore, Billerica, MA, EUA). A transferência foi realizada utilizando o método úmido (101 V, 1 h). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora (TBS-Tween-leite 5%). Posteriormente, a membrana foi incubada *overnight* com o anticorpo primário e depois por 1 h com o anticorpo secundário da empresa Santa Cruz (Dallas, TX, EUA), marcado com peroxidase. A detecção dos imunocomplexos foi realizada pelo método de quimioluminescência utilizando ECL caseiro (1.24 mM luminol, 0.196 mM ácido p-cumárico, 0.1M Tris-HCl pH 8, 3% H₂O₂).

A presença das proformas de IL-1β (p35), caspase-1 (p45) e β-actina foi avaliada por SDS-PAGE do extrato celular (as células foram lisadas diretamente no tampão SDS) seguido de WB com anticorpo específico para IL-1β, caspase-1 e β-actina (Sigma), como descrito para o sobrenadante.

3.12 Representação gráfica e análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas técnicas. Em seguida, a média das replicatas técnicas foi calculada e a média de dois ou mais experimentos foram agrupadas e representadas nos gráficos. Cada experimento foi representado por um símbolo diferente.

As análises estatísticas foram realizadas para experimentos com $n \geq 3$,

utilizando o *software* computacional *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 8. Os testes usados foram ANOVA ou t-test. Valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) foram considerados estatisticamente significativos.

4.1 A flagelina purificada de *S. typhimurium*, tanto em sua forma livre como inserida em vesículas lipídicas, é capaz de ativar inflamassoma em PMs e BMDMs.

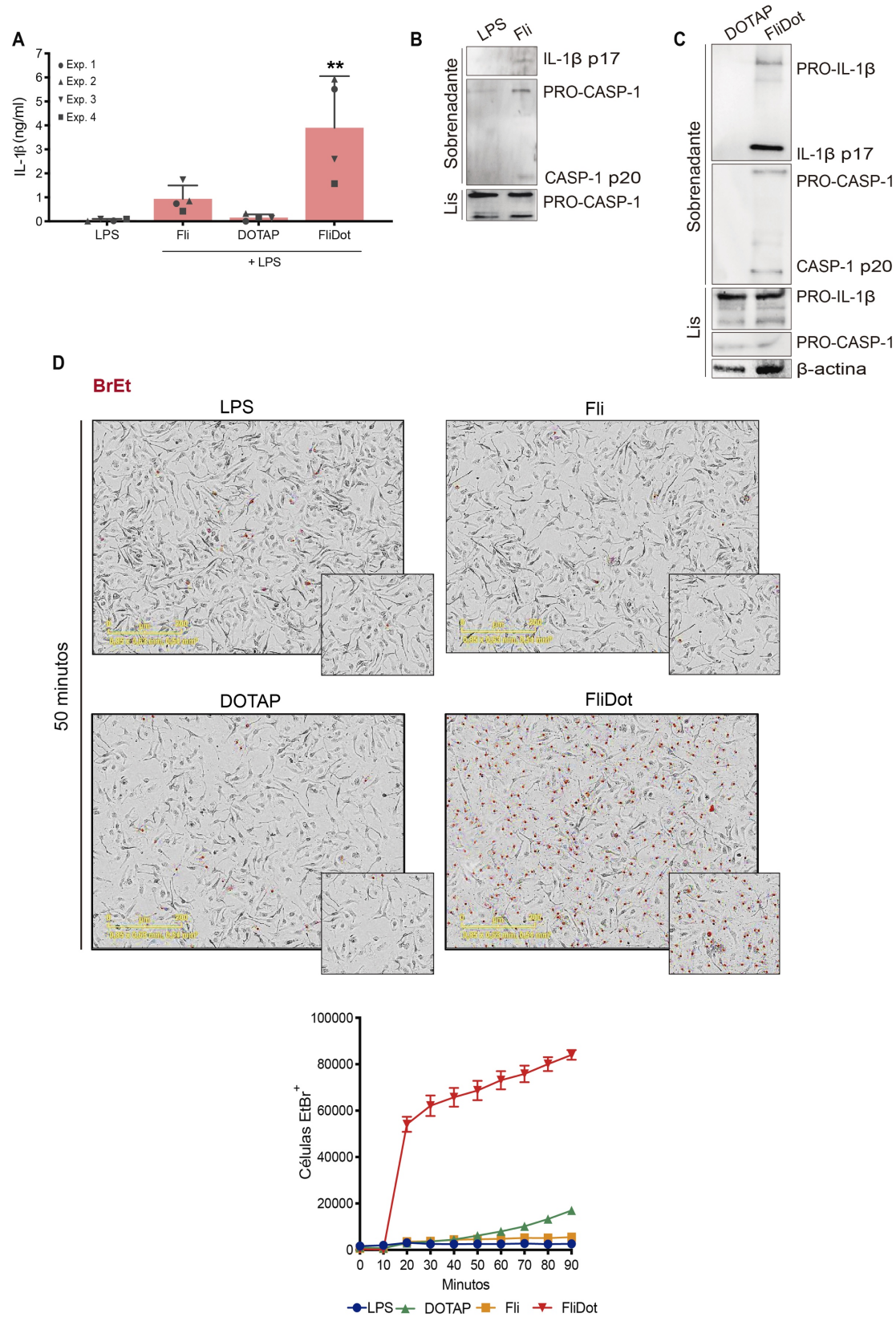
Para confirmarmos o potencial da flagelina purificada de *S. typhimurium* em induzir respostas efetoras mediadas por inflamassomas, estimulamos PMs previamente tratados com LPS (para induzir a transcrição de componentes do inflamassoma) com a flagelina em sua forma livre (Fli) ou inserida na vesícula lipídica catiônica DOTAP (FliDot) (Figura 9). As duas preparações de flagelina, mas não a vesícula DOTAP vazia, foram capazes de induzir a secreção de IL-1 β e a clivagem de caspase-1 (Figura 9A,B,C). A realização de ensaios de WB confirmaram que ambas as estratégias de estimulação com flagelina induziram a clivagem da pró-caspase-1 e da pró-IL-1 β , gerando a liberação das formas maduras dessas proteínas que foram detectadas no sobrenadante das culturas (Figura 9B,C). Contudo, a FliDot induziu respostas mais pronunciadas (Figura 9A,B,C).

Interessante, também observamos que a estimulação com a FliDot, mas não com a Fli, levou a rápida incorporação de BrEt, um indicativo da perda de integridade da membrana celular e de morte celular necrótica (Figura 9D). Ainda que a Fli não induza uma frequência de morte celular significativamente maior que o tratamento com LPS, essa é capaz de gerar a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β ativa. Em conjunto, esses resultados sugerem que a morte celular contribui para a liberação robusta de IL-1 β mas que a secreção dessa citocina pode ocorrer também por células viáveis, como previamente descrito por outros grupos^{151,154}.

BMDMs são células amplamente utilizadas como modelo para avaliar a ativação de inflamassomas. A estimulação de BMDMs com as duas preparações de flagelina também induziu a liberação de IL-1 β e, assim como observado em PMs (Figura 9), a FliDot induziu a secreção de maiores níveis de IL-1 β em comparação com a Fli e a vesícula DOTAP vazia não foi capaz de ativar o inflamassoma (Figura 10A). Além disso, a entrega da proteína BsaK ao citoplasma, outro agonista do inflamassoma NAIP/NLRC4, induziu níveis ainda maiores de IL-1 β (Figura 10A) em comparação com a flagelina. Também pudemos observar que somente as células tratadas com LPS produziram TNF- α (indicativo de ativação do NF- κ B) e que essa não foi afetada pela estimulação com os agonistas de NAIP/NLRC4 (Figura 10B). Em

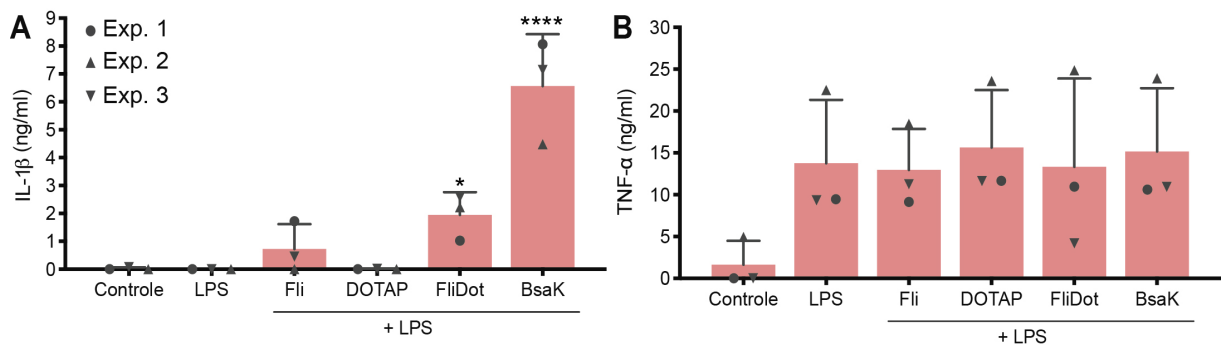
conjunto, esses dados mostram o potencial da flagelina em induzir respostas mediadas por inflamassomas, independente da fonte de macrófago utilizada.

Figura 9 - A flagelina purificada de *S. typhimurium*, tanto em sua forma livre como inserida em vesículas lipídicas, é capaz de ativar o inflamassoma.



(A) Macrófagos peritoneais (PMs) de animais *wild-type* (WT) (5×10^5 células/poço) foram tratados com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli) (3 μ g/ml, 3 h), inserida no DOTAP (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) ou com a vesícula DOTAP vazia (3 h). A secreção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por ELISA. A barra representa a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD, ** $p < 0,01$ (One-way ANOVA) quando comparado a células tratadas somente com LPS ou com LPS + DOTAP. PMs (1×10^6 células/poço) foram tratados com LPS (500 ng/ml, 3 h) e estimulados com Fli por (3 μ g/ml, 6 h) (B), com a vesícula DOTAP vazia ou FliDot (1 μ g/ml, 1,5 h) (C) e a secreção da forma ativa de IL-1 β e de caspase-1, IL-1 β foram detectadas por *western blot* (WB) no sobrenadante das culturas e a pró-caspase-1 (B,C), pró-IL-1 β (C), β -actina (C) foram detectadas por WB nos extratos celulares (B, C). Dados representativos de dois experimentos independentes. (D) PMs (1×10^6 células/poço) foram tratados com LPS por (500 ng/ml, 3 h) e estimulados com Fli (3 μ g/ml), com DOTAP vazia ou com FliDot (3 μ g/ml) por 90 minutos. A citotoxicidade foi avaliada pelo número de PMs corados com brometo de etídio (BrEt) (vermelho, núcleo), que representam as células permeabilizadas, contabilizadas nos tempos indicados utilizando o *Incucyte Live Cell Analysis System*; dados representativos de triplicatas experimentais de dois experimentos independentes. Painel representativo com imagens de PMs tratados com os estímulos indicados após 50 minutos. (A) Cada símbolo representa um experimento independente.

Figura 10 - A flagelina de *S. typhimurium* induz a ativação do inflamassoma em BMDMs.



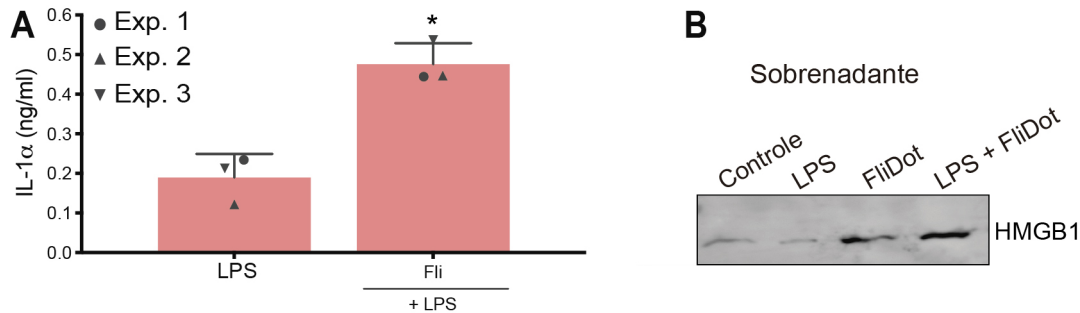
Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) (1×10^5 células/poço) de animais *wild-type* (WT) foram tratados ou não com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli) (3 μ g/ml, 3 h), com a vesícula DOTAP vazia (3 h), com a flagelina ultrapura extraída de *S. typhimurium* inserida na vesícula DOTAP (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) ou com BsaK (100 ng/ml, 1,5 h) + PA (1 μ g/ml, 1,5 h). A secreção de IL-1 β (A) e de TNF- α (B) foi avaliada no sobrenadante das culturas por HTRF. As barras representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ (one-way ANOVA) em relação ao Controle, LPS ou LPS + DOTAP. Cada símbolo representa a média de um experimento independente.

4.2 A flagelina purificada de *S. typhimurium* induz liberação de DAMPs.

Além dos mecanismos efetores clássicos do inflamassoma, acredita-se que a ativação desses complexos leva à secreção de DAMPs, contribuindo para propagar a inflamação^{160,165–169}. Em contraste com o observado para a IL-1 β , apenas o pré-tratamento com o LPS já foi capaz de induzir a liberação de IL-1 α para o sobrenadante das culturas, indicando que a secreção de IL-1 α pode ocorrer mesmo na ausência da ativação do inflamassoma. Contudo, a estimulação com a flagelina leva a um aumento na secreção dessa alarmina (Figura 11A). PMs parecem ter uma secreção basal de HMGB1 e o tratamento com FliDot induziu a liberação de maiores quantidades de

HMGB1 mesmo na ausência do *priming* (Figura 11B). Esses dados indicam que o tratamento de PMs com flagelina induz a liberação dos DAMPs IL-1 α e HMGB1, que parecem ser diferencialmente regulados.

Figura 11 – A flagelina induz a secreção de DAMPs.

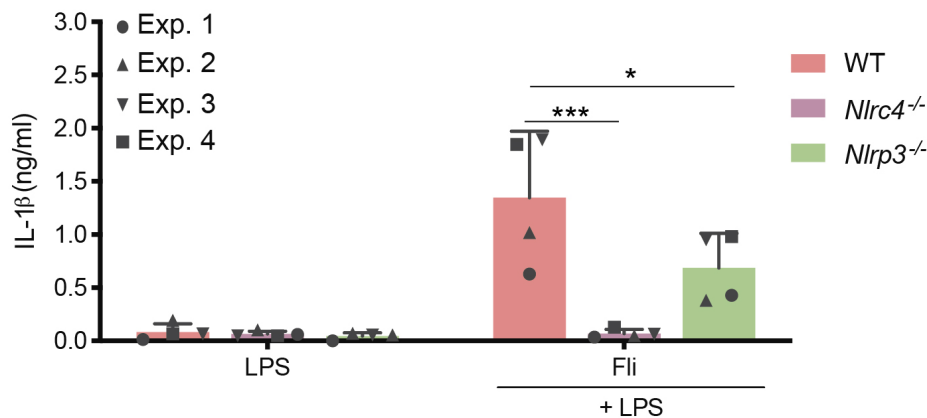


(A) Macrófagos peritoneais (PMs) (5×10^5 células/poço) obtidos de animais *wild-type* (WT) foram tratados com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli) (3 μ g/ml, 3 h). A secreção de IL-1 α foi avaliada no sobrenadante das culturas por ELISA. As barras representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD, * $p < 0,05$ (*paired t-test*). Cada símbolo representa a média de um experimento independente. **(B)** PMs (3×10^6 células/poço) obtidos de animais WT foram tratados com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados flagelina extraída de *S. typhimurium* inserida na vesícula lipídica DOTAP (FliDot) (6 μ g/ml, 6 h). A secreção de HMGB1 foi detectada por *western blot* (WB) dos sobrenadantes das culturas. Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.3 A ativação do inflamassoma em resposta à flagelina é dependente de NLRC4 e parcialmente dependente de NLRP3 em PMs.

A flagelina é um dos principais agonistas de NAIP5/NLRC4 estudados²⁰⁴. No entanto, Qu e colaboradores descreveram o envolvimento de NLRP3 na otimização da secreção de IL-1 β em resposta à flagelina¹¹⁶. Para verificar o requerimento de NLRC4 e NLRP3 para a ativação do inflamassoma em resposta à flagelina, estimulamos PMs deficientes para NLRC4 e deficientes para NLRP3 com a Fli para descartar qualquer possível interferência da vesícula de transfecção na ativação de NLRP3. Conforme esperado, macrófagos *Nlrc4*^{-/-} tiveram a secreção de IL-1 β abolida (Figura 12), enquanto as células *Nlrp3*^{-/-} apresentaram uma redução nos níveis de IL-1 β (Figura 12). Esses dados confirmam o papel essencial e parcial de NLRC4 e NLRP3, respectivamente, nas respostas à flagelina.

Figura 12 – A secreção de IL-1 β em resposta à flagelina em PMs é dependente de NLRC4 e parcialmente dependente de NLRP3



Macrófagos peritoneais (PMs) (5×10^5 células/poço) de animais *wild-type* (WT), *Nlrc4*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} foram tratados com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli) (3 μ g/ml, 3 h). A secreção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por ELISA. As barras representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA). Cada símbolo representa a média de um experimento independente.

4.4 Ativação do inflamassoma em resposta à flagelina é regulada por catepsinas lisossomais e ocorre independente de fagocitose.

O nosso grupo descreveu que a transfecção de macrófagos com flagelina derivada de *B. subtilis* (FLADot) é capaz de ativar uma via lisossomal que contribui para a secreção de IL-1 β em resposta à esse agonista¹²¹. Até então, o extravasamento das catepsinas lisossomais era comumente associado a ativação de NLRP3 em resposta a agonistas particulados¹³³.

Para avaliarmos se essa via lisossomal também era ativada pela flagelina de *S. typhimurium*, realizamos os estímulos na presença de Ca-074Me, inibidor presumidamente específico de catepsina B, ou na presença do inibidor de E64d, inibidor de pancatepsinas. Como controle positivo do envolvimento de catepsinas na ativação do inflamassoma, estimulamos os PMs com cristais de MSU e os BMDMs com cristais de sílica, agonistas particulados de NLRP3. A adição de Ca-074Me ou de E64d à cultura reduziu de maneira semelhante a secreção de IL-1 β em resposta ao MSU (Figura 13A) em PMs, e a adição do Ca-074Me inibiu a secreção de IL-1 β em resposta à sílica em BMDMs (Figura 13B). No entanto, o Ca-074Me não parece impactar a secreção de IL-1 β em resposta ao ATP em PMs, sugerindo que a inibição

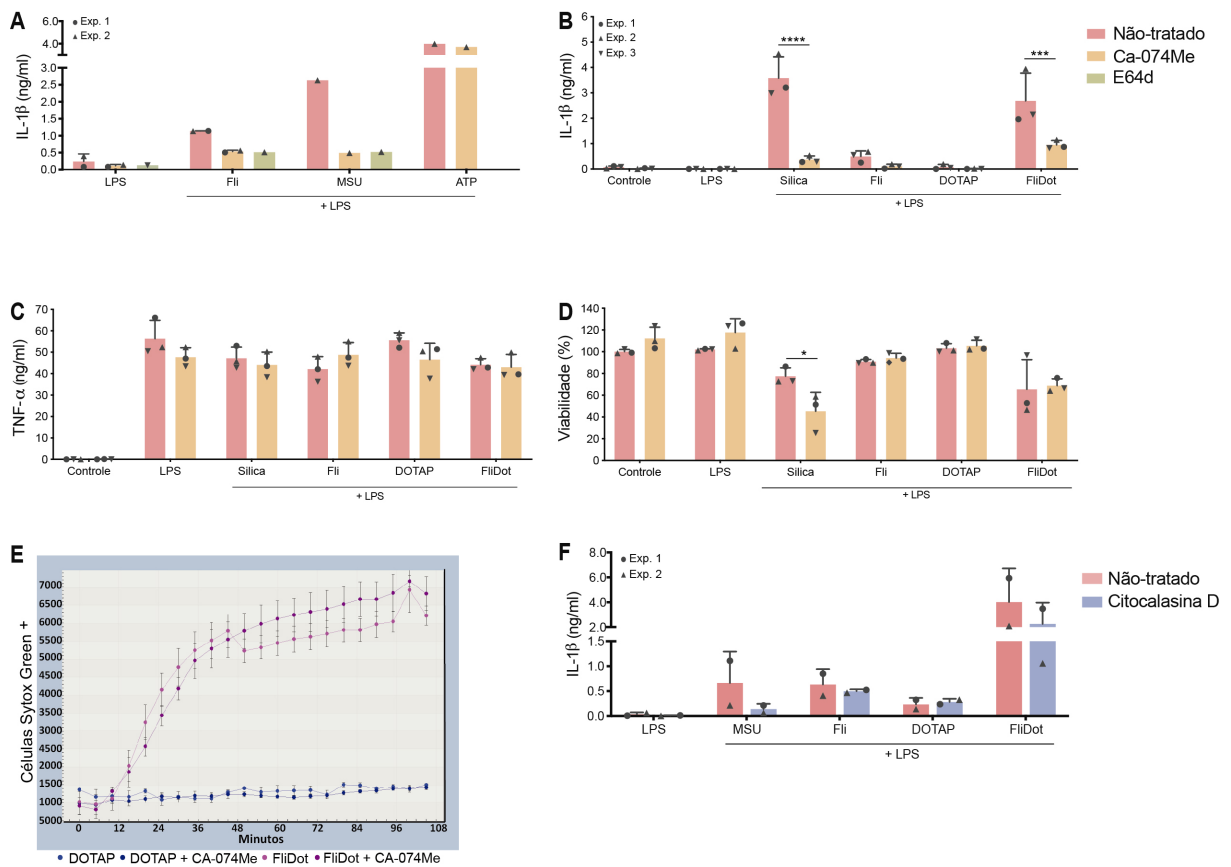
da catepsina B não impacta a liberação de IL-1 β em resposta a todos os agonistas de NLRP3 (Figura 13A).

Assim como visto para a FLADot, a inibição das catepsinas reduziu a liberação de IL-1 β em resposta à Fli em PMs e BMDMs (Figura 13A,B) e também à FliDot (Figura 13B). Novamente, a vesícula lipídica vazia não foi capaz de induzir a secreção de IL-1 β . A flagelina parece desencadear a via lisossomal independentemente da estratégia utilizada para a sua entrega ao citoplasma, uma vez que a liberação de IL-1 β gerada pela Fli ou pela FliDot foi afetada pela inibição das catepsinas.

O tratamento com Ca-074Me foi capaz de diminuir a liberação de IL-1 β sem qualquer impacto na produção de TNF- α , indicando que a ativação de NF- κ B não foi afetada. Ainda, a concentração de Ca-074Me utilizada não foi citotóxica para BMDMs, como avaliada por CTB (Figura 13D) e tampouco para PMs, uma vez que a adição do inibidor à cultura não induziu a incorporação do corante *Sytox Green*, que é impermeável a células com a membrana íntegra (Figura 13E). Além disso, o tratamento com o inibidor não alterou a frequência de morte induzida pela flagelina (Figura 13D,E), indicando que o Ca-074Me não atua modulando a morte celular, como descrito anteriormente por nosso grupo¹²¹.

O próximo passo foi avaliar se a fagocitose seria o mecanismo responsável pela internalização da flagelina e consequente ativação do inflamassoma. Para isso, estimulamos PMs com Fli e FliDot (Figura 13F) na presença de citocalasina D, um inibidor de fagocitose. Como controle positivo de ativação de inflamassoma dependente de fagocitose, utilizamos o MSU (Figura 13F), uma vez que para ativação do inflamassoma NLRP3 em resposta a material particulado é necessário que ocorra a internalização da partícula via fagocitose⁵⁹. A adição de citocalasina D ao meio de cultura inibiu a secreção de IL-1 β induzida pelo MSU de maneira significativa, como esperado. No entanto, tanto a Fli como a FliDot foram capazes de induzir a liberação de IL-1 β mesmo com a inibição da fagocitose, indicando que esse é um mecanismo dispensável para a internalização da flagelina e ativação do inflamassoma (Figura 13F).

Figura 13 – As catepsinas lisossomais contribuem para a secreção de IL-1 β .



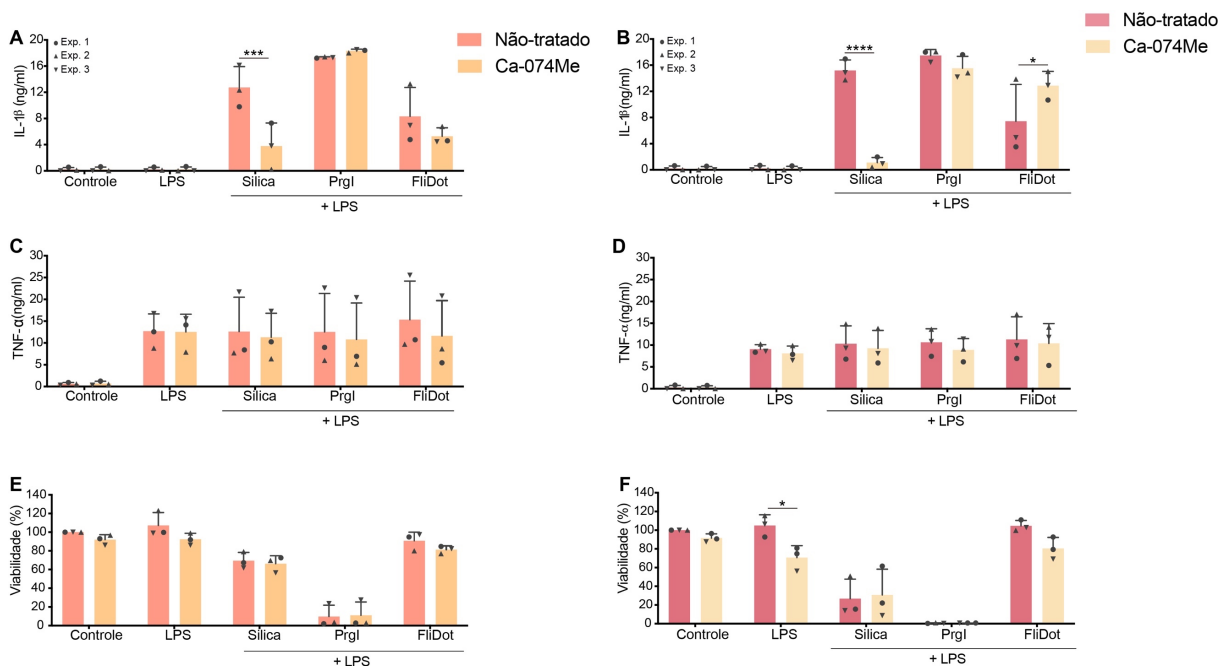
(A) Macrófagos peritoneais (PMs) (5×10^5 células/poço) obtidos de animais *wild-type* (WT) foram tratados ou não com os inibidores de catepsina Ca-074Me e E64d ($25 \mu\text{M}$, 1,5 h). Em seguida, foram tratados com LPS (200 ng/ml , 3 h) e estimulados com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli) ($3 \mu\text{g/ml}$, 3 h), com MSU ($100 \mu\text{g/ml}$, 6 h) ou com ATP (5 mM , 30 minutos) na presença dos inibidores. A secreção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por ELISA. As barras representam a média de um ou dois experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD. **(B-D)** Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) (1×10^5 células/poço) de animais WT foram tratados ou não com Ca-074Me ($25 \mu\text{M}$, 1,5 h). Em seguida, foram tratados ou não com LPS (200 ng/ml , 3 h) e estimulados com sílica ($250 \mu\text{g/ml}$, 6 h), com Fli ($3 \mu\text{g/ml}$, 3 h), com a vesícula DOTAP vazia (3 h) ou com a flagelina inserida na vesícula DOTAP (FliDot) ($3 \mu\text{g/ml}$, 3 h) na presença do inibidor. A secreção de IL-1 β **(B)** e de TNF- α **(C)** foi avaliada no sobrenadante das culturas por HTRF e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio *Cell Titer Blue* (CTB) **(D)**. **(B-D)** As barras representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$ (*two-way ANOVA*). **(E)** PMs (5×10^5 células/poço) obtidos de animais selvagens foram tratados ou não com Ca-074Me ($25 \mu\text{M}$, 1,5 h) e, em seguida, foram tratados com LPS (200 ng/ml , 3 h) e estimulados com DOTAP ou FliDot ($3 \mu\text{g/ml}$). A citotoxicidade foi avaliada pelo número de PMs marcados com Sytox Green, que representam as células permeabilizadas, contabilizadas nos tempos indicados utilizando o *Incucyte Live Cell Analysis System*; dados representativos de triplicatas experimentais. **(F)** PMs (5×10^5 células/poço) de animais WT foram tratados com LPS (200 ng/ml , 3 h) e posteriormente tratados ou não com Citocalasina D ($5 \mu\text{M}$, 1,5 h). Em seguida, foram estimulados com MSU ($100 \mu\text{g/ml}$, 6 h) com Fli ($3 \mu\text{g/ml}$, 3 h), com a vesícula DOTAP vazia ou com FliDot ($3 \mu\text{g/ml}$, 3 h). A secreção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por ELISA. As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD. **(A,E)** Cada símbolo representa um experimento independente. **(A-D, F)** Cada símbolo representa a média de um experimento independente.

4.5 A IL-1 β induzida por flagelina não é regulada por catepsinas em macrófagos primários humanos.

Em macrófagos de camundongos, nossos dados sugerem que a inibição da catepsina diminui a liberação de IL-1 β em resposta à flagelina por um mecanismo independente da indução de morte celular e sem impactar a ativação de NF- κ B.

Para investigar se as catepsinas regulam a secreção de IL-1 β em resposta a agonistas de NLRC4 em macrófagos humanos primários, geramos hMDMs diferenciados com GM-CSF (hGM-MDMs) ou M-CSF (hM-MDMs). Em contraste com o observado em células murinas, os níveis de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de hGM-MDMs ou hM-MDMs não foram significativamente afetados pelo tratamento com Ca-074Me em resposta à FliDot (Figura 14A,D). Além disso, o Ca-074Me não diminuiu a liberação de IL-1 β em resposta à PrgI, componente de T3SS e agonista de NAIP/NLRC4 (Figura 14A,D). Como foi observado nas células murinas, o Ca-074Me não afetou a produção de TNF- α (Figura 14B,E) ou a viabilidade celular (Figura 14C,F). Os dados obtidos com os hMDMs sugerem que as catepsinas não participam da ativação do inflamassoma em resposta à flagelina nessas células.

Figura 14 – A IL-1 β induzida por flagelina não é regulada por catepsinas em macrófagos humanos



Macrófagos humanos diferenciados a partir de monócitos CD14⁺ (hMDMs) (1×10^5 células/poço) diferenciados com rhGM-CSF (A,C,E) ou com rhM-CSF (B,D,F) foram tratados ou não com Ca-074Me (25 μ M, 1,5 h). Em seguida, foram tratados ou não com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com sílica (250 μ g/ml, 6 h), com Prgl (500 ng/ml, 1,5 h) + PA (1 μ g/ml, 1,5 h) ou com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* inserida na vesícula DOTAP (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) na presença do inibidor. A secreção de IL-1 β (A,B) e de TNF- α (C,D) foi avaliada no sobrenadante das culturas por HTRF e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio *Cell Titer Blue* (CTB) (E,F). As barras representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD. * $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (two-way ANOVA). (A-F) Cada símbolo representa a média de um experimento independente.

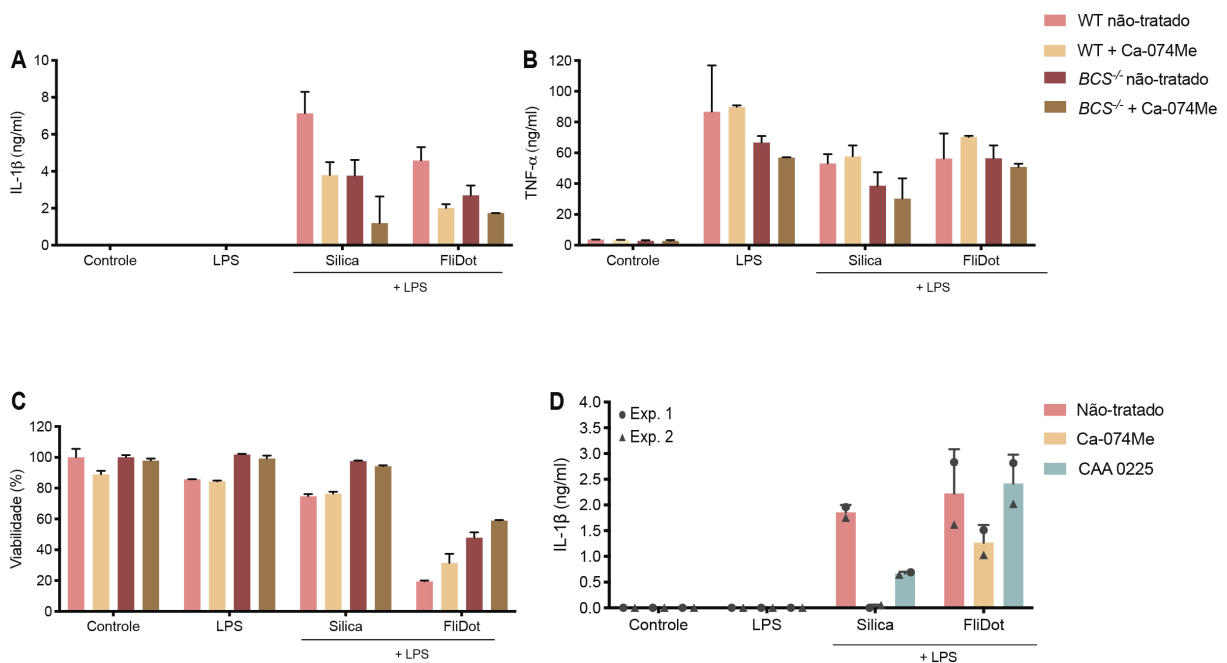
4.6 A deleção simultânea das catepsinas B, C e S reduz a liberação de IL-1 β .

Dados da literatura indicam que nas concentrações que o Ca-074Me é capaz de inibir a liberação de IL-1 β dependente de NLRP3, esse pode inibir múltiplas catepsinas^{81,82}. Ainda, as catepsinas B, C, L, S e Z podem ter papéis redundantes na ativação do NLRP3 e a deleção genética de apenas uma catepsina específica pode não ser suficiente para revelar seu papel⁸⁰. Para termos evidência genética do envolvimento das catepsinas na liberação de IL-1 β , utilizamos BMDMs deficientes para as catepsinas B, C e S (*BCS*^{-/-}). A redução da liberação de IL-1 β pelas células *BCS*^{-/-} em resposta à sílica e ao FliDot foi comparável à inibição promovida pelo Ca-074Me nas células WT (Figura 14A), sem ter qualquer efeito sobre a viabilidade celular ou na secreção de TNF- α (Figura 14B,C). No entanto, as células *BCS*^{-/-} tratadas com Ca-074Me liberaram ainda menos IL-1 β , indicando que outras catepsinas podem

desempenhar um papel minoritário na ativação do inflamassoma em resposta à sílica e flagelina (Figura 14A). Como só pudemos realizar um experimento com as células *BCS*^{-/-}, outras repetições são necessárias para confirmar esse resultado.

Já foi sugerido que a catepsina L contribui para a ativação de NLRP3 em resposta a agonistas particulados e que essa possui papéis redundantes com a catepsina B⁸⁰. Para verificar se a catepsina L estaria envolvida, estimulamos BMDMs WT com o inibidor específico da catepsina L CAA 0225. A adição desse inibidor foi capaz de reduzir significativamente a liberação de IL-1 β em resposta à sílica, mas não em resposta a FliDot, sugerindo que a catepsina L é dispensável para ativação do inflamassoma em resposta à flagelina (Figura 14D).

Figura 15 – A deleção simultânea das catepsinas B,C,S reduz a liberação de IL-1 β



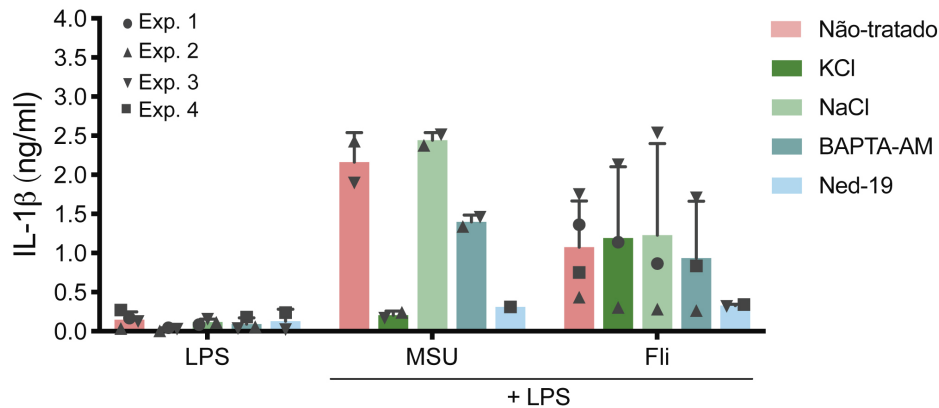
(A-C) Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) (1×10^5 células/poço) de animais *wild-type* (WT) ou *BCS*^{-/-} foram tratados ou não com Ca-074Me (25 μ M, 1,5 h). Em seguida, foram tratados ou não com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com sílica (250 μ g/ml, 6 h) ou com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* inserida na vesícula DOTAP (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) na presença do inibidor. A secreção de IL-1 β **(A)** e de TNF- α **(B)** foi avaliada no sobrenadante das culturas por HTRF e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio *Cell Titer Blue* (CTB) **(C)**. Os números representam a média de duplicatas experimentais de um experimento. **(D)** BMDMs de animais WT foram tratados ou não com Ca-074Me (25 μ M, 1,5 h) ou com CAA 0225 (25 μ M, 1,5 h). Em seguida, foram tratados ou não com LPS por (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com sílica (250 μ g/ml, 6 h) ou com (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) na presença dos inibidores. A secreção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por HTRF. As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD. Cada símbolo representa a média de um experimento independente.

4.7 A mobilização de Ca^{2+} de estoques lisossomais contribui para regular a secreção de IL-1 β .

Como já foi descrito que o dano lisossomal pode participar *upstream* a alterações no balanço iônico e dessa maneira contribuir com a ativação do inflamassoma^{35,38}, o próximo passo foi investigar se a mobilização de íons também poderia contribuir para a ativação do inflamassoma em resposta à flagelina. Para bloquearmos o efluxo de K^+ , nós estimulamos os PMs em meio contendo altas concentrações de KCl e avaliamos a secreção de IL-1 β . O bloqueio do efluxo intracelular de K^+ inibiu a secreção de IL-1 β em resposta ao MSU, como esperado, mas não teve efeito na IL-1 β liberada em resposta à Fli. Ainda, a estimulação dos PMs com MSU e Fli em meio contendo altas concentrações de NaCl não foi capaz de alterar a produção de IL-1 β em resposta aos estímulos, indicando que o bloqueio do efluxo de K^+ intracelular, mas não o de Cl^- , afetou a resposta induzida pelo MSU e que o efluxo desses íons parece não ser importante para modular as respostas à Fli (Figura 15).

Para verificarmos se o influxo de Ca^{2+} de reservatórios intracelulares poderiam influenciar na resposta à flagelina, estimulamos os PMs na presença de BAPTA-AM, um quelante de Ca^{2+} intracelular, ou na presença de Ned-19, um análogo estrutural de NAADP. Esse inibidor se liga diretamente receptores de NAADP em lisossomos, impedindo o transporte de Ca^{2+} dessa organela. A adição de BAPTA-AM reduziu parcialmente a secreção de IL-1 β em resposta ao MSU, mas não teve efeito na liberação de IL-1 β induzida pela flagelina (Figura 16). No entanto, os dados obtidos com Ned-19 foram interessantes, uma vez que esse inibidor reduziu significativamente a liberação de IL-1 β em resposta à Fli e ao MSU (Figura 16). A sinalização via liberação de Ca^{2+} é importante para o funcionamento dos lisossomos²⁰⁵ e a inibição promovida pelo Ned-19 com a consequente inibição de IL-1 β reforçam a importância do lisossomo para a ativação do inflamassoma em resposta à flagelina e ao MSU.

Figura 16 - A mobilização de Ca^{2+} de estoques lisossomais contribui para regular a secreção de IL-1 β .



Macrófagos peritoneais (PMs) (5×10^5 células/poço) obtidos de animais *wild-type* (WT) foram tratados com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com MSU (100 $\mu\text{g/ml}$, 6 h) ou com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli) (3 $\mu\text{g/ml}$, 3 h), na presença de 30 mM de KCl ou NaCl. Os inibidores BAPTA-AM e Ned-19 (100 μM) foram adicionados 1,5 h antes dos estímulos com MSU ou Fli. A secreção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por ELISA. As barras representam a média de até quatro experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD. Cada símbolo representa a média de um experimento independente.

4.8 Catepsinas lisossomais modulam a produção de IL-1 β em resposta à flagelina independentemente da ativação de NLRP3.

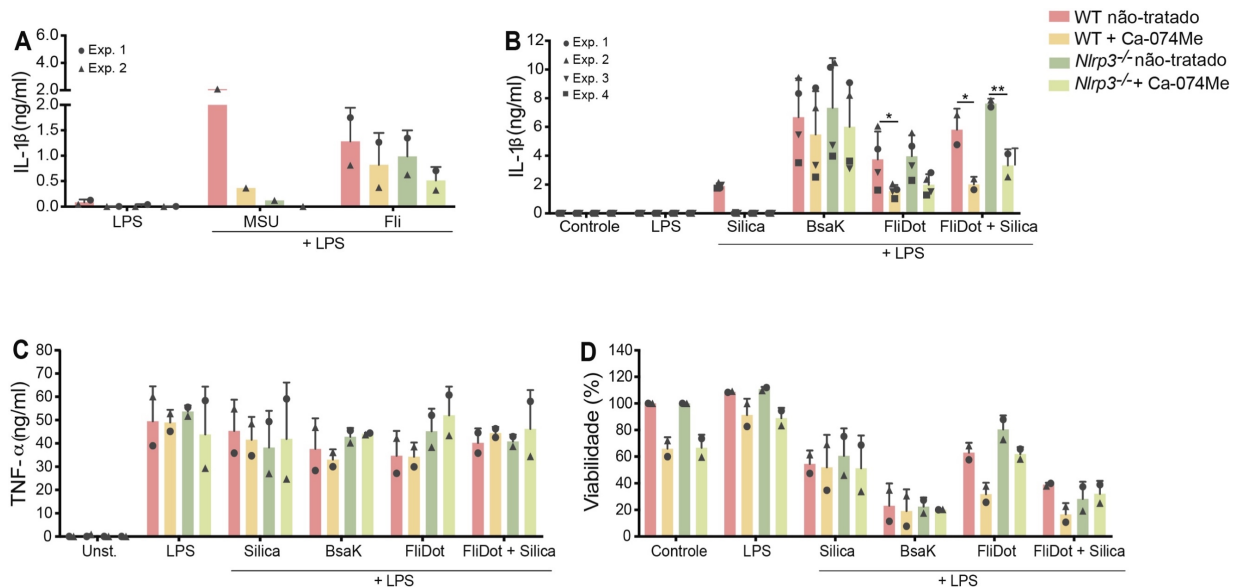
Dado que as catepsinas lisossomais e a mobilização de íons são vias comumente relacionadas à ativação de NLRP3¹³³, o qual está parcialmente envolvido com a resposta à flagelina (Figura 12) decidimos investigar se as catepsinas modulam a liberação de IL-1 β por meio da ativação desse sensor. Para isso, estimulamos PMs e BMDMs WT e *Nlrp3*^{-/-} com Fli e FliDot, respectivamente, na presença de Ca-074Me. Como visto em 4.3 (Figura 12), os PMs *Nlrp3*^{-/-} secretaram níveis mais baixos em comparação com o WT (Figura 17A). No entanto, os BMDMs deficientes para *Nlrp3* apresentaram níveis comparáveis de IL-1 β em relação aos BMDMs WT (Figura 17B).

Apesar dessa diferença no requerimento de NLRP3 para a ativação do inflamassoma em resposta à flagelina, a produção de IL-1 β por PMs e BMDMs *Nlrp3*^{-/-} foi afetada na mesma extensão que as células WT na presença do Ca-074Me, indicando que o inibidor modula a liberação de IL-1 β de maneira independente da ativação de NLRP3 (Figura 17A,B) nos dois tipos celulares. Interessante, em contraste com o observado para a flagelina, a secreção de IL-1 β induzida por BsaK, componente

de T3SS, parece ser independente da atividade das catepsinas (Figura 17B) e tampouco foi diminuída em células *Nlrp3*^{-/-}.

Uma outra estratégia para verificarmos o papel do lisossomo na ativação do inflamassoma e que essa via atuaria independentemente da ativação de NLRP3, estimulamos BMDMs com a FliDot juntamente com a sílica, que induz o rompimento do lisossomo⁶⁸. A combinação dos dois estímulos foi capaz de aumentar a produção de IL-1 β mesmo por células *Nlrp3*^{-/-}. Uma vez que a resposta à sílica é abolida em BMDMs *Nlrp3*^{-/-}, a IL-1 β produzida em resposta à combinação da sílica + FliDot não foi dependente de NLRP3 e foi aparentemente dependente de NAIP/NLRC4. Ainda, o tratamento com o Ca-074Me inibiu a secreção de IL-1 β nessa condição, sugerindo que a desestabilização lisossomal contribui para aumentar a liberação dessa citocina mesmo na ausência de NLRP3 (Figura 17B).

Figura 17 - As catepsinas atuam independentemente de NLRP3 na secreção de IL-1 β



(A) Macrófagos peritoneais (PMs) (5×10^5 células/poço) obtidos de animais *wild-type* (WT) ou *Nlrp3*^{-/-} foram tratados ou não com Ca-074Me (25 μ M). Em seguida, foram tratados com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com MSU (100 μ g/ml, 6 h) ou com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli) (3 μ g/ml, 3 h) na presença do inibidor. A secreção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por ELISA. As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicatas experimentais \pm SD. **(B-D)** Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) (1×10^5 células/poço) de animais WT ou *Nlrp3*^{-/-} foram tratados ou não com Ca-074Me (25 μ M, 1,5 h). Em seguida, foram tratados ou não com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com sílica (250 μ g/ml, 6 h), com BsaK (100 ng/ml, 1,5 h) + PA (1 μ g/ml, 1,5 h) ou com flagelina ultrapura extraída de *S. typhimurium* inserida na vesícula DOTAP (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) na presença do inibidor. A secreção de IL-1 β **(B)** e de TNF- α **(C)** foi avaliada no sobrenadante das culturas por HTRF e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio *Cell Titer Blue* (CTB) **(D)**. **(A,C,D)** As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicatas técnicas \pm SD. **(B)** Os números

representam a média de dois ou quatro experimentos independentes \pm SD; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (*three-way ANOVA*). **(A-D)** Cada símbolo representa a média de um experimento independente.

4.9 Catepsinas participam da clivagem de IL-1 β , mas não são requeridas para induzir a formação de *specks* de ASC e nem a maturação de caspase-1.

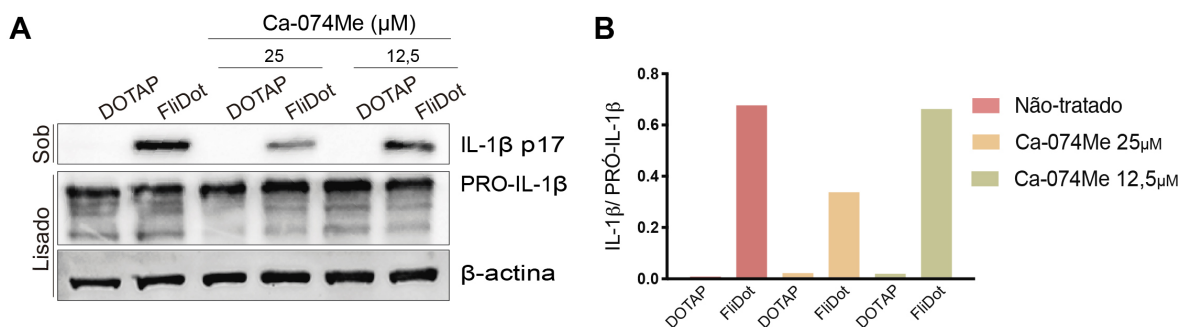
Já foi previamente sugerido que os inibidores de catepsinas, como o Ca-074Me, interferem na transcrição da pró-IL-1 β (sinal 1) e também na secreção da forma ativa dessa citocina (sinal 2) em resposta à agonistas de NLRP3⁸¹. Para verificarmos se as catepsinas também seriam importantes para a transcrição da pró-IL-1 β (sinal 1) e/ou clivagem de IL-1 β em resposta à flagelina, realizamos ensaios de WB para avaliar a forma inativa e a forma ativa dessa proteína. Em macrófagos estimulados com flagelina na presença de 12,5 μ M ou 25 μ M de Ca-074Me não conseguimos observar diferenças significativas na proforma de IL-1 β (Figura 18). Contudo, a adição de Ca-074Me foi capaz de reduzir claramente a presença da forma ativa de IL-1 β no sobrenadante das culturas (Figura 18). Esse dado sugere que diferentemente do que foi descrito para agonistas clássicos de NLRP3, as catepsinas não parecem participar da síntese da pró-IL-1 β em resposta à flagelina, mas são requeridas para a maturação dessa citocina. Sendo assim, a inibição das catepsinas não parece impactar a atividade de NF- κ B, uma vez que não afetou a síntese da proforma de IL-1 β e nem de TNF- α (Figuras 10B, 13C, 15B, 17C), citocinas que tem a transcrição gênica mediada por esse fator.

Para verificarmos quais etapas da via da formação do inflamassoma seria afetada pela ação das catepsinas, o próximo passo foi avaliar a formação de agregados de ASC e a clivagem de caspase-1, etapas cruciais para a maturação da IL-1 β mediada por essa maquinaria. Os inflamassomas formados por NLRC4 são capazes de recrutar e ativar a caspase-1 diretamente ou através da molécula adaptadora ASC. No entanto, os níveis de IL-1 β são significativamente mais baixos em macrófagos deficientes em ASC, indicando que a agregação de ASC em *specks* permite uma produção otimizada de IL-1 β ¹¹². Como nossos dados sugerem que as catepsinas contribuem para a secreção de IL-1 β madura, e que a formação de agregados de ASC pode ser modulada por catepsinas lisossomais em resposta à agonistas de NLRP3^{85,86}, decidimos investigar se as catepsinas contribuem para a formação de *specks* de ASC no nosso modelo. Para isso, utilizamos BMDMs de

camundongos repórter (ASC-mCitrine). As células foram tratadas com Ca-074Me e, para evitar a perda de *specks* de ASC devido à indução da morte celular por piroptose, bloqueamos a atividade da caspase-1 com o inibidor VX-765 antes da estimulação com os agonistas de inflamassoma. A formação de *specks* de ASC-mCitrine em resposta à sílica foi inibida na presença de Ca-074Me (Figura 19A,B). Diferentemente do que foi observado para a sílica, a inibição de catepsinas não reduziu a agregação de ASC em resposta à BsaK e nem à FliDot, sugerindo que as catepsinas modulam a produção de IL-1 β por outro mecanismo (Figura 19A,B). Interessante, mesmo que a Fli seja capaz de gerar a secreção de IL-1 β , é um fraco indutor de *speck* de ASC uma vez que somente cerca de 1% das células formaram agregados de ASC.

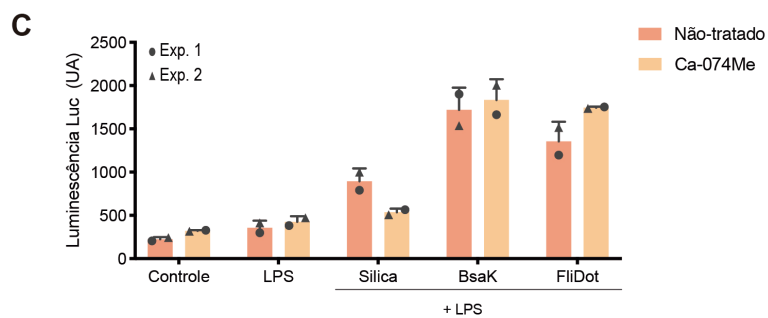
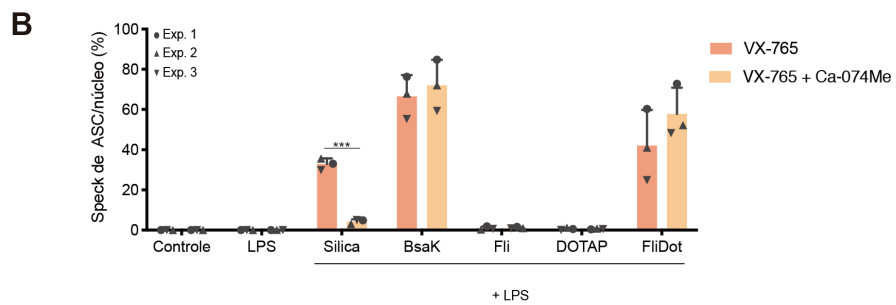
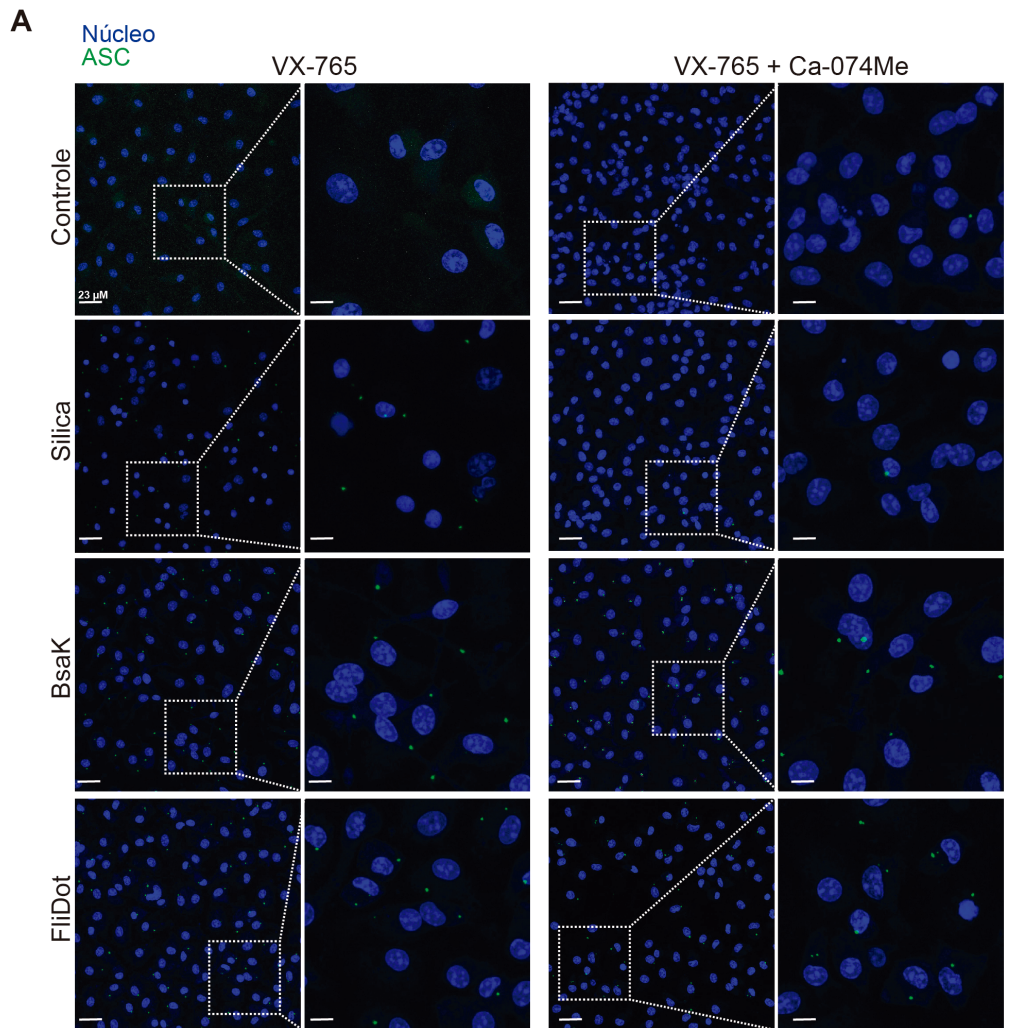
A maturação da caspase-1 na forma ativa ocorre após a ativação do NAIP/NLRC4 e pode ocorrer *downstream* a formação do *speck* de ASC. A fim de quantificar a atividade da caspase-1 nos sobrenadantes das células, utilizamos o ensaio Caspase-Glo®. Em consonância com o que foi observado para a formação de *specks* de ASC, a inibição das catepsinas reduziu parcialmente a atividade da caspase-1 em resposta à sílica, mas não em resposta aos ativadores da NAIP/NLRC4, indicando que as catepsinas não contribuem para a clivagem de caspase-1 (Figura 19C). Em conjunto, esses dados indicam que as catepsinas não são requeridas para a formação do complexo, mas sim para a clivagem de IL-1 β , abrindo a possibilidade de que as catepsinas modulam outras vias intracelulares que contribuem para induzir a clivagem/liberação de IL-1 β .

Figura 18 - As catepsinas lisossomais contribuem com a clivagem de IL-1 β .



Macrófagos peritoneais (1×10^6 células/poço) de camundongos WT foram tratados com 25 ou 12,5 μ M do inibidor Ca-074Me por 1,5 h. Em seguida, foram tratados com LPS (500 ng/ml, 3 h) e estimulados com FliDot (1 μ g/ml, 1,5 h) na presença do inibidor. **(A)** A secreção da forma ativa de IL-1 β foi detectada por *western blot* (WB) do sobrenadante das culturas e a proforma de IL-1 β e a β -actina foram detectadas por WB dos extratos celulares. **(B)** Análise de densitometria realizada utilizando o software *ImageJ*. A expressão relativa de IL-1 β foi normalizada pela PRÓ-IL-1 β . Dados representativos de dois experimentos independentes.

Figura 19 - Catepsinas não são requeridas para induzir a formação de *specks* de ASC e nem ativação da caspase-1 em resposta à flagelina



(A,B) Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) ($0,8 \times 10^5$ células/poço) de animais repórter para ASC (ASCmCitrine) foram tratados ou não com o Ca-074Me (25 μ M, 1,5 h). Em seguida, foram tratados ou não com LPS (200 ng/ml, 3 h). Antes da estimulação com os agonistas, as células foram tratadas com o inibidor de caspase-1 VX-765 (20 μ M, 10 minutos) e então estimuladas com sílica (250 μ g/ml, 6 h), com BsaK (100 ng/ml, 1,5 h) + PA (1 μ g/ml, 1,5 h) ou com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* na sua forma livre (Fli), com a vesícula DOTAP vazia ou com a flagelina inserida no DOTAP (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) na presença dos inibidores. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de epifluorescência, com uma magnificação de 200X para quantificação.

(A) Painel com imagens representativas adquiridas com um sistema de varredura a laser confocal com magnificação de 630X mostrando a formação de agregados de ASC no citoplasma. ASC (verde, mCitrine), núcleo (azul, DRAQ5). **(B)** Quantificação de células com *speck* de ASC⁺. Dados representativos de três experimentos independentes. As barras representam a média de três experimentos independentes \pm SD **(B)**, *** $p < 0,001$, (two-way ANOVA). **(C)** BMDMs (1×10^5 células/poço) de animais *wild-type* (WT) foram tratados ou não com o inibidor de catepsina B Ca-074Me (25 μ M, 1,5 h). Em seguida, foram tratados ou não com LPS (200 ng/ml, 3 h) e estimulados com sílica (250 μ g/ml, 6 h), com BsaK (100 ng/ml, 1,5 h) + PA (1 μ g/ml, 1,5 h) ou com flagelina ultrapura extraída de *Salmonella typhimurium* inserida no DOTAP (FliDot) (3 μ g/ml, 3 h) na presença do inibidor. A atividade de caspase-1 no sobrenadante das culturas foi medida com o ensaio Caspase-Glo®. As barras representam a média de dois experimentos independentes \pm SD. Cada símbolo representa a média de um experimento independente. AU, unidades arbitrárias; Luc, luciferase.

Os inflamassomas foram primeiramente descritos em 2002 por Martinon e colaboradores para descrever complexos de alto peso molecular que recrutam e ativam caspases, levando à produção e à secreção das formas ativas de IL-1 β e IL-18 e a morte celular por piroptose²⁰⁶. Apesar do amplo conhecimento gerado sobre o funcionamento e a estrutura molecular dos inflamassomas, os mecanismos que regulam a ativação dessas maquinarias moleculares ainda não estão completamente elucidados.

A flagelina é um PAMP amplamente estudado devido ao seu potencial imunogênico, uma vez que é capaz de ativar o TLR5 na superfície das células e o inflamassoma NAIP/NLRC4 no citoplasma, além de direcionar a resposta imune adaptativa²⁰⁷. Durante a infecção bacteriana, a flagelina é liberada como um monômero e é inserida no citosol celular através do T3SS ou T4SS presentes em bactérias patogênicas. Para o estudo da ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4 por um agonista único, estratégias para a entrega da flagelina purificada no citoplasma são comumente utilizadas como a sua inserção em vesículas lipídicas^{91,121,198,200} ou fusão à LT (FlaTox)^{190,191}. Nossos resultados sugerem que a flagelina de *S. typhimurium* é capaz de adentrar o citosol celular por um mecanismo independente de fagocitose (Figura 13F), e mesmo na ausência de sistemas de transfecção (Figura 9,11, 12). No entanto, o estímulo com FliDot foi capaz de induzir a secreção de IL-1 β de maneira mais potente em comparação com a Fli, sugerindo que a entrega do agonista na presença da vesícula seja mais eficiente.

Como esperado, a resposta à flagelina foi mediada por NAIP/NLRC4 em PMs e BMDMs. No entanto, observamos que o NLRP3 também participa da resposta a esse agonista em PMs (Figura 12), como descrito anteriormente por Qu e colaboradores¹¹⁶. Importante, as vesículas lipídicas parecem não interferir nas respostas dos inflamassomas à flagelina, uma vez que a transfecção de macrófagos com a DOTAP vazia não foi capaz de gerar a secreção de IL-1 β e tampouco induzir a clivagem de caspase-1, sugerindo que as concentrações de DOTAP utilizadas não foram capazes de ativar o inflamassoma por si só. Esse fato é importante especialmente para descartar efeitos secundários dessas vesículas no envolvimento do NLRP3 (Figuras 12 e 17), uma vez que já foi sugerido que lipossomos podem gerar distúrbios citoplasmáticos que por fim ativam o NLRP3²⁰⁸.

O modelo classicamente aceito para a ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4 pela flagelina se dá pela interação do agonista com o receptor NAIP5 ou NAIP6, os

quais, após sofrerem mudança conformacional seriam capazes de recrutar NLRC4^{110,111}. No entanto, as evidências de que a flagelina é capaz de induzir a fosforilação de NLRC4 independentemente do seu reconhecimento via NAIP¹¹⁵ e dados anteriores do nosso grupo mostrando o envolvimento de uma via lisossomal na resposta de macrófagos à flagelina de *B. subtilis*¹²¹, levantam a possibilidade de que esse inflamassoma também possa ser modulado por alterações citoplasmáticas, além do modelo ligante-receptor, assim como descrito para o inflamassoma NLRP3¹³³. De fato, a inibição farmacológica ou a ablação genética das catepsinas lisossomais interferiu com a secreção de IL-1 β em resposta à flagelina (Figuras 13A,B 15A,D 17A,B e 18), mesmo na ausência de NLRP3 (Figura 17A,B) mostrando que a modulação acontece no inflamassoma NAIP/NLRC4.

Agonistas particulados de NLRP3, como o MSU e a sílica, geram danos no lisossoma levando ao extravasamento de catepsinas para o citoplasma⁵⁹. No entanto, ainda é controverso se o inflamassoma NLRP3 é ativado diretamente por essas catepsinas lisossomais, uma vez que também foi descrito que a estimulação de BMDMs com agonistas particulados levam em última instância ao efluxo intracelular de K⁺, outro mecanismo proposto para a ativação de NLRP3³⁵. Com efeito, o bloqueio do efluxo de K⁺ foi capaz de inibir a secreção de IL-1 β em resposta aos MSU, mas não em resposta à flagelina (Figura 16). Assim, os nossos dados demonstram pela primeira vez que as catepsinas são importantes para regular as respostas mediadas por inflamassomas de maneira independente do efluxo de K⁺. Ademais, o fato de que o bloqueio do canal de Ca²⁺ lisossomal, mas não a ação do quelante BAPTA-AM, também ser capaz de limitar a secreção de IL-1 β em resposta à flagelina (Figura 16), reforça o papel central do lisossomo na modulação das respostas a esse agonista.

Apesar de ainda ser debatido o mecanismo pelo qual o dano lisossomal ativa o NLRP3, as catepsinas podem estar envolvidas na fase de ativação e também priming desse inflamassoma⁸². Uma vez que a modulação do inflamassoma NAIP/NLRC4 pelas catepsinas ainda é fato bastante recente e pouco estudado¹²¹, o mecanismo pelo qual essas proteases atuam nunca havia sido demonstrado. Aqui verificamos que a expressão da proforma de IL-1 β (Figura 18) e a secreção de TNF- α (Figuras 13C,17B) em células tratadas com o Ca-074Me ou por células *BCS*^{-/-} (Figura 15B) não foram alteradas pela ausência/inibição das catepsinas, ao contrário da inibição observada nos níveis de IL-1 β ativa. Esses resultados indicam que no

nosso modelo as catepsinas atuam apenas na fase efetora, e não têm papel no *priming* do inflamassoma.

Mesmo que seja conhecido que as diferentes catepsinas possam ter efeitos redundantes/compensatórios e da capacidade do Ca-07Me de inibir outras catepsinas, a catepsina B provavelmente é a principal candidata na modulação da resposta à flagelina. Essa catepsina possui atividade residual no pH neutro do citoplasma e até mesmo no meio extracelular^{78,79,209}. Ainda, a inibição da catepsina L, que reduziu os níveis de IL-1 β produzidos em resposta à sílica, não foi capaz de afetar a secreção de IL-1 β em resposta à flagelina (Figura 15D), mostrando uma vez mais que os mecanismos envolvidos na modulação da resposta de NLRC4 parecem distintos dos atuantes na modulação de NLRP3. Em consonância, nos macrófagos estimulados com sílica, a inibição das catepsinas bloqueou a formação de *specks* de ASC (Figura 19A,B) e também reduziu a ativação da caspase-1 (Figura 19C), indicando a atuação dessas proteases na fase de montagem e efetora do inflamassoma NLRP3. Surpreendentemente, a inibição das catepsinas em macrófagos estimulados com flagelina não reduziu a formação de *punctas* de ASC (Figura 19A,B) e tampouco a atividade da caspase-1 (Figura 19C). Com efeito, esses dados sugerem que a participação das catepsinas na clivagem e/ou liberação da IL-1 β ocorre *downstream* à ativação da caspase-1 ou por uma via paralela, que não é dependente dessa protease.

Além da caspase-1, outras proteases podem levar a maturação da IL-1 β , como as serino-proteases elastase²¹⁰, catepsina G²¹⁰ e a caspase-8¹⁹⁷. A caspase-8 está classicamente envolvida com a apoptose e a necroptose, que são vias de morte celular reguladas¹⁶⁰. Contudo, diversos estudos demonstram que essa protease também está envolvida com a modulação das respostas mediadas por inflamassomas, especialmente os formados por NAIP/NLRC4^{120,193–196}. Embora haja discrepâncias nos estudos quanto à capacidade da caspase-8 em induzir a maturação da IL-1 β de maneira dependente da ativação dos inflamassomas, o seu recrutamento parece ser um importante mecanismo acessório para amplificar a inflamação. Diversos trabalhos sugerem que a caspase-8 somente é recrutada via ASC para o complexo inflamassoma na ausência ou inibição da caspase-1, exercendo um papel compensatório^{191–193,196}. No entanto, o papel da caspase-8 na clivagem de IL-1 β é controverso. Nos estudos realizados por Man e colaboradores foi sugerido que a caspase-8 é recrutada juntamente com a caspase-1 para o inflamassoma em resposta

à infecção com *S. typhimurium*, contribuindo para induzir uma secreção de IL-1 β mais robusta^{120,195}, ao passo que outros trabalhos sugerem que a ativação da caspase-8 *downstream* à ativação do inflamassoma não é suficiente para a produção de IL-1 β ^{194,196}. Ainda, Schneider e colaboradores sugerem que a caspase-8 é capaz de induzir uma robusta produção de IL-1 β , mesmo que tardia, na ausência de caspase-1 ativa¹⁹³.

Ainda que as catepsinas não pareçam ter papel na agregação de ASC e na maturação da caspase-1, é possível que essas interfiram na atividade da caspase-8. De fato, já foi demonstrado que essas proteases lisossomais estão envolvidas com a degradação de proteínas anti-apoptóticas²¹¹ e com a ativação de caspase-8²¹². Considerando a contribuição crucial da caspase-8 para respostas mediadas por inflamassoma¹⁹⁷, e a capacidade de catepsinas em ativar essa protease, é possível que em nosso modelo as catepsinas estejam contribuindo para ativar essa protease, que, por sua vez aumenta a secreção de IL-1 β . Contudo, uma vez que a liberação de IL-1 β é abolida na ausência de NLRC4, a participação da caspase-8 para a maturação de IL-1 β ocorreria após a formação do inflamassoma NAIP5/NLRC4, e não como um mecanismo independente dessa maquinaria.

Outro possível mecanismo de atuação das catepsinas poderia ser pela modulação de vias de secreção propostas para IL-1 β , que são firmemente reguladas devido ao papel altamente inflamatório dessa citocina. Apesar da liberação da IL-1 β estar comumente associada à piroptose, há um crescente número de evidências que sugerem que essa possa ser desacoplada da indução dessa morte celular^{153,154,157}. Após a maturação da IL-1 β mediada pela caspase-1, essa é direcionada para a membrana plasmática, onde interage com o componente fosfolipídico Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2, do inglês *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*). A interação da IL-1 β madura com PIP2 favorece a sua liberação de maneira dependente e independente de GSDMD. A secreção de IL-1 β independente de GSDMD²¹³ é lenta e pode ser utilizada por células viáveis que mantêm uma prolongada secreção de IL-1 β , como os neutrófilos¹⁵⁷, ou por células que não expressam GSDMD ou quando essa encontra-se inibida²¹³. Esses recentes achados indicam que a liberação de IL-1 β é um processo ativamente regulado. Uma vez que os nossos dados indicam que a estimulação com a Fli livre é capaz de induzir a liberação de IL-1 β , mesmo com uma frequência de morte celular e de formação de agregados de ASC similares a de células não estimuladas, e que a inibição das

cathepsinas reduz os níveis de IL-1 β em resposta às duas preparações de flagelina sem alterar frequência de células viáveis, (Figuras 13D,E, 15C, 17D) as cathepsinas poderiam afetar a atividade da GSDMD e/ou da PIP2, impactando a liberação ativa de IL-1 β .

Além do transporte realizado diretamente pela membrana plasmática e via GSDMD, já foi descrito que a IL-1 β pode ser transportada ativamente por vesículas para o meio extracelular²¹⁴⁻²¹⁷. Dentre os mecanismos vesiculares propostos, podemos destacar os mediados por lisossomos secretórios^{214,215} ou por vesículas autofágicas²¹⁷. Embora o envolvimento de lisossomos secretórios não seja amplamente aceito, recentemente foi descrito que vesículas LAMP2A⁺ levam à secreção de baixos níveis de IL-1 β em monócitos tratados com LPS. Nesse estudo, sugere-se que estímulos pouco intensos induzem a secreção de IL-1 β controlada por lisossomos secretórios e que estímulos potentes induzem a liberação mediada por GSDMD e piroptose²¹⁸. Já a secreção mediada por vesículas autofágicas foi acompanhada da secreção de cathepsina B madura e o tratamento com Ca-074Me reduziu os níveis de IL-1 β detectados²¹⁷. Em conjunto, esses trabalhos indicam outras possíveis vias de atuação das cathepsinas para modular o transporte de IL-1 β para o meio extracelular .

Apesar das controvérsias em relação às vias utilizadas para mediar a secreção de IL-1 β , é provável que os diferentes mecanismos coexistam para orquestrar o extravasamento dessa citocina de maneira adequada frente ao estímulo. Sendo assim, as vias vesiculares ou a secreção diretamente através da membrana plasmática parecem ser importantes para estímulos leves e, por outro lado, o engajamento da GSDMD e a indução de morte celular necrótica parecem ser induzidas em resposta à estímulos potentes²¹⁹. Nós observamos que a estimulação com BsaK (Figuras 11A, 17B) e PrgI (Figura 13A,B) são muito mais potentes do que com a flagelina, induzindo níveis maiores de secreção de IL-1 β e de morte celular. Em resposta a esses agonistas, a inibição das cathepsinas não reduziu a liberação de IL-1 β , sugerindo que para esses agonistas a secreção diretamente através da membrana ou por vesículas possam ser superadas pela indução de morte celular. Além disso, as diferenças nos mecanismos de externalização de IL-1 β observadas nos estudos publicados podem relacionar-se com o tipo celular estudado, indicando que diferentes tipos celulares podem engajar vias distintas para a liberação de IL-1 β . Por certo, os macrófagos murinos e humanos utilizados nesse estudo podem engajar vias distintas

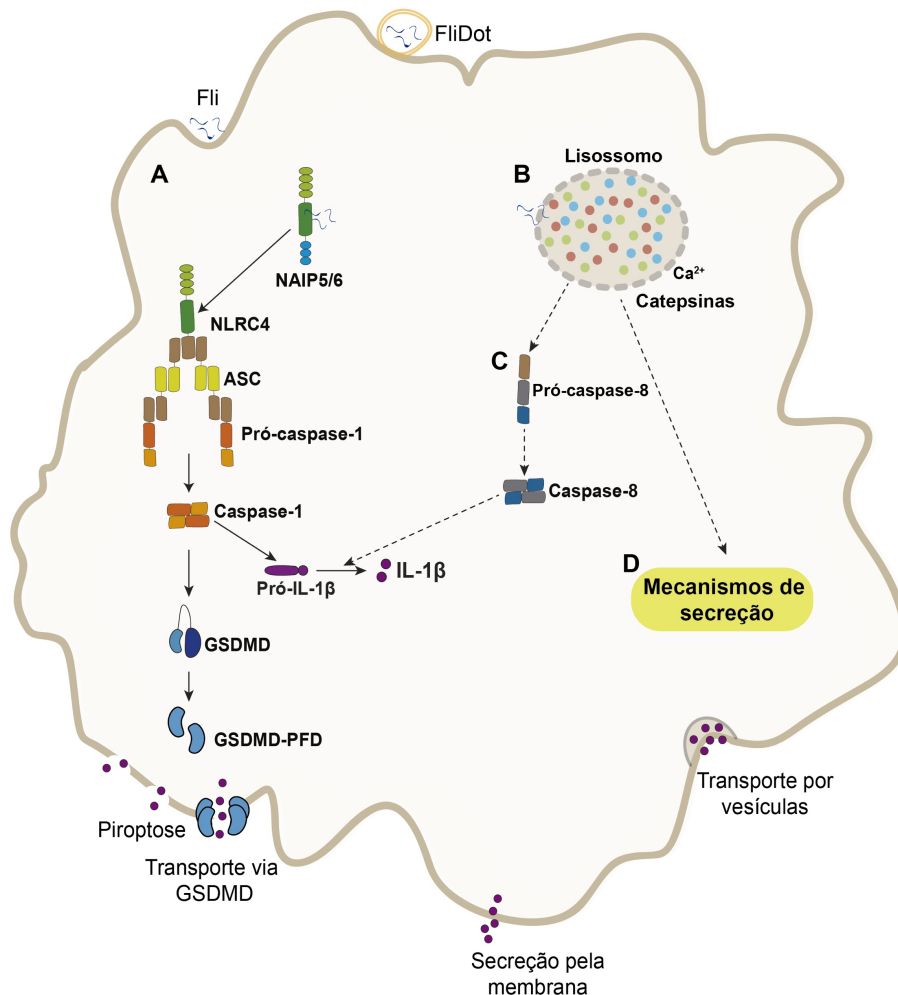
para mediar a secreção de IL-1 β , podendo justificar os resultados discrepantes observados. Sendo assim, as diferenças notadas destacam a importância de estudar diferentes células para o completo entendimento de como a ativação dos inflamassomas é regulada.

Além dos papéis redundantes das catepsinas, essas cisteíno-proteases possuem uma ampla especificidade de substratos que frequentemente estão relacionados com o contexto da célula²⁰⁹. Desse modo, é possível que as catepsinas regulem as respostas dos inflamassomas através da modulação de diferentes alvos e de maneira concomitante. Em conjunto, os dados apresentados abrem a possibilidade de que as respostas mediadas pelo inflamassoma NAIP/NLRC4 possam ser moduladas em resposta a alterações causadas na homeostase celular e não apenas a produtos bacterianos, indicando que diferentes mecanismos além da detecção do ligante contribuem para desencadear os mecanismos efetores. Ademais, a natureza e a intensidade do estímulo parecem influenciar as respostas mediadas pelos inflamassomas.

Nas patologias estéreis descritas em que há ativação exacerbada de NLRC4, ainda não se sabe como esse inflamassoma é ativado e tampouco os mecanismos envolvidos na regulação dessa maquinaria. Uma vez que alterações na homeostase celular parecem contribuir para regular as respostas mediadas por NLRC4, a via lisossomal descrita pelo nosso grupo pode contribuir para amplificar a inflamação decorrente da ativação desregulada desse inflamassoma. Dessa maneira, a modulação da atividade das catepsinas pode ser benéfica e um possível alvo para tratamento de patologias não-infecciosas em que a hiperativação dos inflamassomas é deletéria. Com efeito, a completa compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação e regulação dos inflamassomas é extremamente importante para o desenvolvimento de terapias apropriadas para o tratamento de doenças infecciosas e patologias inflamatórias relacionadas à sinalização aberrante dessas plataformas moleculares.

Os dados apresentados nessa tese mostram que as catepsinas lisossomais, especialmente a catepsina B, regulam a secreção de IL-1 β em resposta à flagelina, principal agonista do inflamassoma NAIP/NLRC4. A atuação das catepsinas não acontece na fase de *priming* e nem na fase de montagem do inflamassoma, sugerindo o seu papel em mecanismos não convencionais de maturação ou secreção de IL-1 β (Figura 20).

Figura 20 – A via lisossomal contribui para amplificar a secreção de IL-1 β em resposta à flagelina



A estimulação de macrófagos com flagelina livre (Fli) ou inserida em vesículas lipídicas é capaz de ativar o inflamassoma NAIP/NLRC4 (A) e induzir a maturação da pró-caspase-1, pró-IL-1 β e de Gasdermina D (GSDMD) e também induzir uma via lisossomal (B). Essa via contribui para amplificar a secreção de IL-1 β por um mecanismo ainda não completamente elucidado. Os mecanismos sugeridos são através da clivagem da caspase-8 (C), que ativa a pró-L-1 β ou através da modulação de mecanismos de secreção não-convencionais (D), como através da secreção passiva resultante da piroptose ou via o transporte ativo mediado por GSDMD, pela membrana plasmática ou através do transporte por vesículas. Fonte: autoria própria.

REFERÊNCIAS¹

1. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
2. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4–9 (1997).
3. Srikrishna, G. & Freeze, H. H. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* **11**, 615–28 (2009).
4. Bortoluci, K. R. & Medzhitov, R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: Role of TLR and NLR. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 1643–1651 (2010).
5. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–84 (2010).
6. Broz, P. & Monack, D. M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 551–65 (2013).
7. Yamamoto, M., Takeda, K. & Akira, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* **40**, 861–868 (2004).
8. Ting, J. P. Y. *et al.* The NLR gene family: An official nomenclature. *Immunity.* **28**, 285–287 (2008).
9. Proell, M., Riedl, S. J., Fritz, J. H., Rojas, A. M. & Schwarzenbacher, R. The Nod-Like Receptor (NLR) family: A tale of similarities and differences. *PLoS One* **3**, (2008).
10. Hu, Z. *et al.* Crystal Structure of NLRC4 Reveals Its Autoinhibition Mechanism. *Science (80-.)*. **341**, 172–175 (2013).
11. Hu, Z. & Chai, J. Structural Mechanisms in NLR Inflammasome Assembly and Signaling. in 23–42 (2016). doi:10.1007/978-3-319-41171-2_2
12. Platnich, J. M. & Muruve, D. A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* (2019). doi:10.1016/j.abb.2019.02.008
13. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).

¹- De acordo com Estilo Vancouver

14. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–20 (2016).
15. Lu, A. *et al.* Unified polymerization mechanism for the assembly of asc-dependent inflammasomes. *Cell* **156**, 1193–1206 (2014).
16. Sborgi, L. *et al.* Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2015). doi:10.1073/pnas.1507579112
17. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* **140**, 821–832 (2010).
18. Place, D. E. & Kanneganti, T.-D. Recent advances in inflammasome biology. *Curr. Opin. Immunol.* **50**, 32–38 (2018).
19. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
20. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666–671 (2015).
21. He, W. T. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* **25**, 1285–1298 (2015).
22. Ming, S., Rajendra, M. & Kanneganti, K. T. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis , inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. **277**, 61–75 (2017).
23. Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* **29**, 301–5 (2001).
24. Feldmann, J. *et al.* Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 198–203 (2002).
25. Aganna, E. *et al.* Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum.* **46**, 2445–2452 (2002).
26. Rowczenio, D. M. *et al.* Late-Onset Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes Caused by Somatic NLRP3 Mosaicism—UK Single Center Experience. *Front. Immunol.* **8**, 1410 (2017).
27. Leemans, J. C., Cassel, S. L. & Sutterwala, F. S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol. Rev.* **243**, 152–162 (2011).
28. Tartey, S. & Kanneganti, T. Differential role of the NLRP 3 inflammasome in

- infection and tumorigenesis. *Immunology* **156**, 329–338 (2019).
29. He, Y., Hara, H. & Núñez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* **xx**, 1–10 (2016).
 30. Py, B. F., Kim, M. S., Vakifahmetoglu-Norberg, H. & Yuan, J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Mol. Cell* **49**, 331–338 (2013).
 31. Mangan, M. S. J. *et al.* Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 588–606 (2018).
 32. Próchnicki, T. & Latz, E. Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. *Cell Metabolism* (2017). doi:10.1016/j.cmet.2017.06.018
 33. Kanneganti, T. D. & Lamkanfi, M. K⁺ Drops Tilt the NLRP3 Inflammasome. *Immunity* **38**, 1085–1088 (2013).
 34. Franchi, L. *et al.* Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K⁺ efflux. *J. Immunol.* **193**, 4214–4222 (2014).
 35. Muñoz-Planillo, R. *et al.* K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**, 1142–1153 (2013).
 36. Muñoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L. S. & Núñez, G. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0900729
 37. Compan, V. *et al.* Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* (2012). doi:10.1016/j.immuni.2012.06.013
 38. Gong, T., Yang, Y., Jin, T., Jiang, W. & Zhou, R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. *Trends Immunol.* **39**, 393–406 (2018).
 39. Petrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 1583–1589 (2007).
 40. Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* (2017). doi:10.1016/j.immuni.2017.06.020
 41. Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117–121 (2011).
 42. Schmid-Burgk, J. L. *et al.* A genome-wide CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) screen identifies NEK7 as an essential

- component of NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* **291**, 103–109 (2016).
43. He, Y. *et al.* NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* **000**, 1–5 (2016).
 44. Shi, H. *et al.* NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat. Immunol.* **17**, 1–12 (2015).
 45. Groß, C. J. *et al.* K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* (2016). doi:10.1016/j.immuni.2016.08.010
 46. Sanman, L. E. *et al.* Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death. *Elife* (2016). doi:10.7554/elife.13663
 47. Wickliffe, K. E., Leppla, S. H. & Moayeri, M. Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome. *Cell. Microbiol.* **0**, 070915190224001-??? (2007).
 48. Verhoef, P. A., Kertesz, S. B., Lundberg, K., Kahlenberg, J. M. & Dubyak, G. R. Inhibitory Effects of Chloride on the Activation of Caspase-1, IL-1 Secretion, and Cytolysis by the P2X7 Receptor. *J. Immunol.* (2014). doi:10.4049/jimmunol.175.11.7623
 49. Daniels, M. J. D. *et al.* Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nat. Commun.* (2016). doi:10.1038/ncomms12504
 50. Tang, T. *et al.* CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* (2017). doi:10.1038/s41467-017-00227-x
 51. Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047–58 (2007).
 52. Murakami, T. *et al.* Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 11282–11287 (2012).
 53. Haneklaus, M., O'Neill, L. A. J. & Coll, R. C. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: Recent developments. *Current Opinion in Immunology* **25**, 40–45 (2013).
 54. Lee, G.-S. *et al.* The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* **492**, 123–7 (2012).
 55. Zhang, Y. *et al.* A Membrane Potential- and Calpain-Dependent Reversal of Caspase-1 Inhibition Regulates Canonical NLRP3 Inflammasome. (2018). doi:10.1016/j.celrep.2018.07.098

56. Katsnelson, M. A., Rucker, L. G., Russo, H. M. & Dubyak, G. R. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *J. Immunol.* **194**, 3937–52 (2015).
57. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–5 (2010).
58. Misawa, T. *et al.* Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* **14**, 454–460 (2013).
59. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–56 (2008).
60. Shimada, K. *et al.* Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* **36**, 401–414 (2012).
61. Zhong, Z. *et al.* New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **560**, 198–203 (2018).
62. Yu, J. *et al.* Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2014). doi:10.1073/pnas.1414859111
63. Heid, M. E. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J. Immunol.* **191**, 5230–8 (2013).
64. Chen, J. & Chen, Z. J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **564**, 71–76 (2018).
65. Martinon, F. *et al.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–241 (2006).
66. Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat. Immunol.* (2008). doi:10.1038/ni.1636
67. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
68. Franklin, B. S., Mangan, M. S. & Latz, E. Crystal Formation in Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 173–202 (2016).
69. Gyparaki, M.-T. & Papavassiliou, A. G. Lysosome: the cell's 'suicidal bag' as a promising cancer target. *Trends Mol. Med.* **20**, 239–241 (2014).
70. Ballabio, A. The awesome lysosome. *EMBO Mol. Med.* (2016). doi:10.15252/emmm.201505966

71. Li, Z., Berk, M., McIntyre, T. M., Gores, G. J. & Feldstein, A. E. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* **47**, 1495–1503 (2008).
72. Martinon, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* **40**, 616–619 (2010).
73. Turk, V. *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 68–88 (2012).
74. Reiser, J., Adair, B. & Reinheckel, T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Invest.* **120**, 3421–31 (2010).
75. Turk, B. *et al.* Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry* **33**, 14800–6 (1994).
76. Rothberg, J. M. *et al.* Acid-mediated tumor proteolysis: contribution of cysteine cathepsins. *Neoplasia* **15**, 1125–37 (2013).
77. Robey, I. F. *et al.* Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases. *Cancer Res.* **69**, 2260–2268 (2009).
78. Turk, B. *et al.* Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **376**, 225–230 (1995).
79. Ha, S.-D. *et al.* Cathepsin B Is Involved in the Trafficking of TNF- α -Containing Vesicles to the Plasma Membrane in Macrophages. *J. Immunol.* (2014). doi:10.4049/jimmunol.181.1.690
80. Campden, R. I. & Zhang, Y. The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *Arch. Biochem. Biophys.* (2019). doi:10.1016/j.abb.2019.02.015
81. Orłowski, G. *et al.* Multiple cathepsins promote inflammasome-independent, particle-induced cell death during NLRP3-dependent IL-1 β activation. *J. Leukoc. Biol.* (2017).
82. Orłowski, G. M. *et al.* Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 Activation. *J. Immunol.* **195**, 1685–1697 (2015).
83. Averette, K. M. *et al.* Anthrax Lethal Toxin Induced Lysosomal Membrane Permeabilization and Cytosolic Cathepsin Release Is Nlrp1b/Nalp1b-Dependent. *PLoS One* **4**, e7913 (2009).
84. Newman, Z. L., Leppla, S. H. & Moayeri, M. CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infect. Immun.* **77**, 4327–36 (2009).

85. Hara, H. *et al.* Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat. Immunol.* **14**, 1247–55 (2013).
86. Okada, M., Matsuzawa, A., Yoshimura, A. & Ichijo, H. The lysosome rupture-activated TAK1-JNK pathway regulates NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* **289**, 32926–32936 (2014).
87. Terada, K. *et al.* Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin A-stimulated microglia. *Glia* **58**, 114–124 (2010).
88. Sun, L. *et al.* Microglial Cathepsin B Contributes to the Initiation of Peripheral Inflammation-Induced Chronic Pain. *J. Neurosci.* **32**, 11330–11342 (2012).
89. Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* **13**, 397–411 (2013).
90. Miao, E. A. *et al.* Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin-1 β via Ipaf. *Nat. Immunol.* **7**, 569–575 (2006).
91. Franchi, L. *et al.* Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. *Nat. Immunol.* (2006). doi:10.1038/ni1346
92. Zhao, Y. *et al.* The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* **477**, 596–600 (2011).
93. Kofoed, E. M. & Vance, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**, 592–5 (2011).
94. Lightfield, K. L. *et al.* Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect. Immun.* **79**, 1606–1614 (2011).
95. Rauch, I. *et al.* NAIP proteins are required for cytosolic detection of specific bacterial ligands in vivo. *J. Exp. Med.* jem.20151809 (2016). doi:10.1084/jem.20151809
96. Zhao, Y. *et al.* Genetic functions of the NAIP family of inflammasome receptors for bacterial ligands in mice. *J. Exp. Med.* jem.20160006 (2016). doi:10.1084/jem.20160006
97. Ren, T., Zamboni, D. S., Roy, C. R., Dietrich, W. F. & Vance, R. E. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog.* (2006). doi:10.1371/journal.ppat.0020018
98. Tentorey, J. L., Kofoed, E. M., Daugherty, M. D., Malik, H. & Vance, R. E. Molecular Basis for Specific Recognition of Bacterial Ligands by NAIP/NLRC4

- Inflammasomes. *Mol. Cell* **54**, 17–29 (2014).
99. Kortmann, J., Brubaker, S. W. & Monack, D. M. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *J. Immunol.* **195**, 815–9 (2015).
 100. Reyes Ruiz, V. M. *et al.* Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2017). doi:10.1073/pnas.1710433114
 101. Vance, R. E. The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 84–89 (2015).
 102. Duncan, J. A. & Canna, S. W. The NLRC4 Inflammasome. *Immunol. Rev.* **281**, 115–123 (2018).
 103. Sadasivam, S. *et al.* Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis. *Oncogene* (2005). doi:10.1038/sj.onc.1208201
 104. Gutierrez, O., Pipaon, C. & Fernandez-Luna, J. L. Ipaf is upregulated by tumor necrosis factor- α in human leukemia cells. *FEBS Lett.* (2004). doi:10.1016/j.febslet.2004.04.095
 105. Karki, R. *et al.* IRF8 Regulates Transcription of Naips for NLRC4 Inflammasome Activation. *Cell* **173**, 920-933.e13 (2018).
 106. Lu, C. *et al.* Nucleotide binding to CARD12 and its role in CARD12-mediated caspase-1 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1114–1119 (2005).
 107. Yang, J., Zhao, Y., Shi, J. & Shao, F. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14408–14413 (2013).
 108. Zhang, L. *et al.* Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science (80-.)*. **350**, 404–409 (2015).
 109. Hu, Z. *et al.* Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLRC4. *Science (80-.)*. **350**, 399–404 (2015).
 110. Halff, E. F. *et al.* Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. *J. Biol. Chem.* **287**, 38460–38472 (2012).
 111. Tenthorey, J. L. *et al.* Limit Pathogen Immune Evasion. *Science (80-.)*. **893**, 888–893 (2017).
 112. Broz, P., Von Moltke, J., Jones, J. W., Vance, R. E. & Monack, D. M. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* **8**, 471–483 (2010).

113. Qu, Y. Capsule: Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Lett. Nat.* **14**, 751 (2012).
114. Liu, W. *et al.* LRRK2 promotes the activation of NLRC4 inflammasome during *Salmonella Typhimurium* infection. *J. Exp. Med.* **214**, 3051–3066 (2017).
115. Matusiak, M., Van Opdenbosch, N., Vande Walle, L. & Sirard, J. C. Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 1541–1546 (2015).
116. Qu, Y. *et al.* NLRP3 recruitment by NLRC4 during *Salmonella* infection. *J. Exp. Med.* **213**, 877–85 (2016).
117. Broz, P. *et al.* Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J. Exp. Med.* **207**, 1745–55 (2010).
118. McCoy, A. J., Koizumi, Y., Higa, N. & Suzuki, T. Differential regulation of caspase-1 activation via NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* infection. *J Immunol* **185**, 7077–7084 (2010).
119. Gomes, M. T. R. *et al.* Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. *J. Immunol.* **190**, 3629–38 (2013).
120. Man, S. M. *et al.* Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1–6 (2014). doi:10.1073/pnas.1402911111
121. Lage, S. L. *et al.* Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3321-30 (2013).
122. Tomalka, J. *et al.* A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
123. Romberg, N. *et al.* Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. *Nat. Genet.* **46**, 1135–9 (2014).
124. Canna, S. W. *et al.* An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat. Genet.* **46**, 1140–6 (2014).
125. Lopes, A. H. *et al.* Peripheral NLRC4 inflammasome participates in the genesis of acute inflammatory pain. *Pain* **156**, 451–459 (2015).
126. Ip, W. K. E. & Medzhitov, R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome

- activation. *Nat. Commun.* **6**, 6931–6942 (2015).
127. Denes, A. *et al.* AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 4050–5 (2015).
 128. Freeman, L. *et al.* NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. (2017).
 129. Mol Papa, A. *et al.* *Impacto da obesidade no prognóstico do câncer de mama* *Impact of obesity on prognosis of breast cancer.* □ *Revista Brasileira de Oncologia Clínica* □ **9**,
 130. Kolb, R. *et al.* Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nat. Commun.* **7**, 1–12 (2016).
 131. Bhattacharya, M. Could a coffee a day keep the inflammasome away? *Science Translational Medicine* (2017). doi:10.1126/scitranslmed.aam6057
 132. Furman, D. *et al.* Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states. *Nat. Med.* (2017). doi:10.1038/nm.4267
 133. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **1** (2019). doi:10.1038/s41577-019-0165-0
 134. Kovacs, S. B. & Miao, E. A. Gasdermins : Effectors of Pyroptosis. *Trends Cell Biol.* **27**, 673–684 (2017).
 135. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666–671 (2015).
 136. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
 137. Ding, J. *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* **535**, 111–116 (2016).
 138. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
 139. Chen, X. *et al.* Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Nat. Publ. Gr.* **26**, 1007–1020 (2016).
 140. Aglietti, R. A. *et al.* GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. **113**, (2016).
 141. Sborgi, L. *et al.* GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **35**, 1766–1778 (2016).

142. Bergsbaken, T., Fink, S. L., den Hartigh, A. B., Loomis, W. P. & Cookson, B. T. Coordinated host responses during pyroptosis: caspase-1-dependent lysosome exocytosis and inflammatory cytokine maturation. *J Immunol* **187**, 2748–2754 (2011).
143. Miao, E. A. *et al.* Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* **11**, 1136–1142 (2010).
144. Miao, E. A. & Rajan, J. V. Salmonella and Caspase-1: A complex interplay of detection and evasion. *Front. Microbiol.* **2**, (2011).
145. Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B. A. & Miao, E. A. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. 1–16 (2016). doi:10.1084/jem.20151613
146. Jorgensen, I., Lopez, J. P., Laufer, S. A. & Miao, E. A. IL-1 β , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2761–2766 (2016).
147. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* (2016). doi:10.1038/nature18629
148. Monteleone, M., Stow, J. L. & Schroder, K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* **74**, 213–218 (2015).
149. Monteleone, M., Stow, J. L. & Schroder, K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* **74**, 213–218 (2015).
150. Kuriakose, T. & Kanneganti, T. D. Gasdermin D Flashes an Exit Signal for IL-1. *Immunity* (2018). doi:10.1016/j.immuni.2018.01.003
151. Kuriakose, T. & Kanneganti, T.-D. Gasdermin D Flashes an Exit Signal for IL-1. *Immunity* **48**, 1–3 (2018).
152. Feng, S., Fox, D. & Man, S. M. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. *Journal of Molecular Biology* (2018). doi:10.1016/j.jmb.2018.07.002
153. Zanoni, I. *et al.* An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science (80-.)*. **352**, 1232–1236 (2016).
154. Evavold, C. L. *et al.* The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* 1–10 (2017). doi:10.1016/j.immuni.2017.11.013
155. Heilig, R. *et al.* The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *Eur. J. Immunol.* (2018). doi:10.1002/eji.201747404
156. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during

- pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* **8**, 1812–1825 (2006).
157. Chen, K. W. *et al.* The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1?? Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Rep.* **8**, 570–582 (2014).
 158. Schett, G., Dayer, J. M. & Manger, B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology* (2016). doi:10.1038/nrrheum.2016.166
 159. Dinarello, C. A. IL-1: Discoveries, controversies and future directions. *European Journal of Immunology* (2010). doi:10.1002/eji.201040319
 160. Amarante-Mendes, G. P. *et al.* Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front. Immunol.* **9**, 1–19 (2018).
 161. Akira, S. The role of IL-18 in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* (2000). doi:10.1016/S0952-7915(99)00051-5
 162. Kupz, A. *et al.* NLRC4 inflammasomes in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **13**, 162–169 (2012).
 163. Hand, T. W. Interleukin-18: The Bouncer at the Mucosal Bar. *Cell* (2015). doi:10.1016/j.cell.2015.11.041
 164. Canna, S. W. *et al.* Life-threatening NLRC4-associated hyperinflammation successfully treated with IL-18 inhibition. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2017). doi:10.1016/j.jaci.2016.10.022
 165. Vande Walle, L., Kanneganti, T.-D. & Lamkanfi, M. HMGB1 release by inflammasomes. *Virulence* **2**, 162–165 (2011).
 166. Groß, O. *et al.* Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Immunity* **36**, 388–400 (2012).
 167. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
 168. Lu, B. *et al.* Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* **488**, 670–674 (2012).
 169. Bertheloot, D. & Latz, E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: Dual-function alarmins. *Cellular and Molecular Immunology* (2017). doi:10.1038/cmi.2016.34
 170. Bianchi, M. E. & Agresti, A. HMG proteins: Dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics and Development* **15**, 496–506 (2005).

171. Andersson, U. & Tracey, K. J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* **29**, 139–162 (2011).
172. Ito, M. *et al.* Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
173. Oh, Y. J. *et al.* HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J. Immunol.* **182**, 5800–9 (2009).
174. Bonaldi, T. *et al.* The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J.* **21**, 6865–73 (2002).
175. Gardella, S. *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* (2002). doi:10.1093/embo-reports/kvf198
176. Youn, J. H. & Shin, J.-S. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J. Immunol.* **177**, 7889–97 (2006).
177. Oh, Y. J. *et al.* HMGB1 Is Phosphorylated by Classical Protein Kinase C and Is Secreted by a Calcium-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **182**, 5800–5809 (2009).
178. Lamkanfi Sarkar, A., Vande Walle, L., Vitari, A. C., Amer, A. O., Wewers, M D., Tracey, K. J., Kanneganti, T.-D., Dixit, V. M., M. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J. Immunol.* **185**, 4385–4392 (2010).
179. Venereau, E. *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Gen. Physiol.* (2012). doi:10.1085/JGP1404OIA6
180. Schiraldi, M. *et al.* HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.* (2012). doi:10.1084/jem.20111739
181. Andersson, U., Yang, H. & Harris, H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Seminars in Immunology* (2018). doi:10.1016/j.smim.2018.02.011
182. Cohen, I. *et al.* Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2574–9 (2010).
183. Rider, P. *et al.* IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J. Immunol.* **187**, 4835–4843 (2011).

184. Clancy, D. M. *et al.* Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. *Cell Rep.* (2018). doi:10.1016/j.celrep.2018.02.062
185. Yazdi, A. S. & Drexler, S. K. Regulation of interleukin 1 α secretion by inflammasomes. *Ann. Rheum. Dis.* **72 Suppl 2**, ii96-9 (2013).
186. Di Paolo, N. C. & Shayakhmetov, D. M. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat. Immunol.* **17**, 906–13 (2016).
187. Bersudsky, M. *et al.* Non-redundant properties of IL-1 α and IL-1 β during acute colon inflammation in mice. *Gut* (2014). doi:10.1136/gutjnl-2012-303329
188. Dinarello, C. A., Simon, A. & Van Der Meer, J. W. M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* (2012). doi:10.1038/nrd3800
189. Cavalli, G. & Dinarello, C. A. Treating rheumatological diseases and comorbidities with interleukin-1 blocking therapies. *Rheumatology (United Kingdom)* (2015). doi:10.1093/rheumatology/kev269
190. von Moltke, J. *et al.* Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature* **490**, 107–11 (2012).
191. Rauch, I. *et al.* NAIP-NLRC4 Inflammasomes Coordinate Intestinal Epithelial Cell Expulsion with Eicosanoid and IL-18 Release via Activation of Caspase-1 and -8. *Immunity* (2017). doi:10.1016/j.immuni.2017.03.016
192. Lee, B. L. *et al.* ASC- A nd caspase-8-dependent apoptotic pathway diverges from the NLRC4 inflammasome in macrophages. *Sci. Rep.* (2018). doi:10.1038/s41598-018-21998-3
193. Schneider, K. S. *et al.* The Inflammasome Drives GSDMD-Independent Secondary Pyroptosis and IL-1 Release in the Absence of Caspase-1 Protease Activity. *Cell Rep.* (2017). doi:10.1016/j.celrep.2017.12.018
194. Van Opdenbosch, N. *et al.* Caspase-1 Engagement and TLR-Induced c-FLIP Expression Suppress ASC/Caspase-8-Dependent Apoptosis by Inflammasome Sensors NLRP1b and NLRC4. *Cell Rep.* (2017). doi:10.1016/j.celrep.2017.11.088
195. Man, S. M. *et al.* Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1 β production. *J. Immunol.* **191**, 5239–46 (2013).
196. Mascarenhas, D. P. A. *et al.* Inhibition of caspase-1 or gasdermin-D enable caspase-8 activation in the Naip5/NLRC4/ASC inflammasome. *PLoS Pathog.* (2017). doi:10.1371/journal.ppat.1006502
197. Gurung, P. & Kanneganti, T. D. Novel Roles for Caspase-8 in IL-1 β and Inflammasome Regulation. *American Journal of Pathology* (2015).

doi:10.1016/j.ajpath.2014.08.025

198. Buzzo, C. L. *et al.* A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *J. Biol. Chem.* **285**, 32087–32095 (2010).
199. Gonçalves, V. M. *et al.* NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
200. Buzzo, C. de L. *et al.* Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage. *Sci. Rep.* **7**, 41686 (2017).
201. Pacheco, A. L. *et al.* The impairment in the NLRP3-induced NO secretion renders astrocytes highly permissive to *T. cruzi* replication. *J. Leukoc. Biol.* JLB.4AB1118-416RR (2019). doi:10.1002/JLB.4AB1118-416RR
202. Lage, S. L., Amarante-Mendes, G. P. & Bortoluci, K. R. Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. *Methods* **61**, 110–116 (2013).
203. Shenderov, K. *et al.* Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1 β in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. *J. Immunol.* **192**, 2029–33 (2014).
204. Lage, S. L. *et al.* Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).
205. Kiselyov, K., Yamaguchi, S., Lyons, C. W. & Muallem, S. Aberrant Ca²⁺ handling in lysosomal storage disorders. *Cell Calcium* **47**, 103–11 (2010).
206. Martinon, F. *et al.* The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**, 417–26 (2002).
207. Vijayan, A., Rumbo, M., Carnoy, C. & Sirard, J.-C. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. *Trends Microbiol.* **26**, 423–435 (2018).
208. Zhong, Z. *et al.* TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* (2013). doi:10.1038/ncomms2608
209. Kramer, L., Turk, D. & Turk, B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 873–898 (2017).
210. van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A. & Joosten, L. A. B. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* **32**, 110–116 (2011).
211. de Castro, M., Bunt, G. & Wouters, F. Cathepsin B launches an apoptotic exit

- effort upon cell death-associated disruption of lysosomes. *Cell Death Discov.* **2**, 1–8 (2016).
212. Conus, S. *et al.* Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J. Exp. Med.* (2008). doi:10.1084/jem.20072152
213. Monteleone, M. *et al.* Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep.* **24**, 1425–1433 (2018).
214. Andrei, C. *et al.* The Secretory Route of the Leaderless Protein Interleukin 1 β Involves Exocytosis of Endolysosome-related Vesicles. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1463–1475 (1999).
215. Andrei, C. *et al.* Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9745–50 (2004).
216. MacKenzie, A. *et al.* Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **15**, 825–35 (2001).
217. Dupont, N. *et al.* Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* (2011). doi:10.1038/emboj.2011.398
218. Semino, C., Carta, S., Gattorno, M., Sitia, R. & Rubartelli, A. Progressive waves of IL-1 β release by primary human monocytes via sequential activation of vesicular and gasdermin D-mediated secretory pathways. *Cell Death Dis.* **9**, 1088 (2018).
219. Sitia, R. & Rubartelli, A. The unconventional secretion of IL-1 β : Handling a dangerous weapon to optimize inflammatory responses. *Semin. Cell Dev. Biol.* **83**, 12–21 (2018).

LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. Ribeiro, L. S., Migliari Branco, L. & Franklin, B. S. Regulation of innate immune responses by platelets. *Front. Immunol.* **10**, 1320 (2019).
2. Amarante-Mendes, G. P. *et al.* Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front. Immunol.* **9**, 1–19 (2018).
3. Buzzo, C. de L. *et al.* Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage. *Sci. Rep.* **7**, 41686 (2017).
4. Lage, S. L. *et al.* Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).