

MATHEUS GARCIA DE FRAGAS

**Investigando o papel da ativação dos inflamassomas
NLRP1 e CARD8 em modelos de doenças
neurodegenerativas**

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.

Universidade de São Paulo

2023

MATHEUS GARCIA DE FRAGAS

**Investigando o papel da ativação dos inflamassomas
NLRP1 e CARD8 em modelos de doenças
neurodegenerativas**

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: Programa de Pós-Graduação em Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Universidade de São Paulo

2023

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)

Garcia de Fragas, Matheus
Investigando o papel da ativação dos
inflamassomas NLRP1 e CARD8 em modelos de doenças
neurodegenerativas / Matheus Garcia de Fragas;
orientador Niels Olsen Saraiva Câmara. -- São
Paulo, 2023.
59 p.

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

1. Inflamassomas. 2. Fagocitose. 3. Doença de
Alzheimer. 4. Ativação de Macrófagos. 5.
Encefalomielite Autoimune Experimental. I. Olsen
Saraiva Câmara, Niels , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Matheus Garcia de Fragas

Título da Tese: Investigando o papel da ativação dos inflamassomas NLRP1 e CARD8 em modelos de doenças neurodegenerativas.

Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Tese de Doutorado, em sessão pública 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:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Inflamassoma NLRP1 no desenvolvimento da Encefalomielite Autoimune Experimental", protocolada sob o CEUA nº 9885020718, sob a responsabilidade de **Niels Olsen Saraiva Câmara e equipe; Matheus Garcia de Fragas; Meire Ioshie Hiyane; Bruno Ghirotto Nunes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 01/10/2018.

We certify that the proposal "Inflamassoma NLRP1 in the development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", utilizing 122 Isogenics mice (122 females), 80 Genetically modified mice (GMO) (80 females), protocol number CEUA 9885020718, under the responsibility of **Niels Olsen Saraiva Câmara and team; Matheus Garcia de Fragas; Meire Ioshie Hiyane; Bruno Ghirotto Nunes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 10/01/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade ou peso: **8 a 12 semanas**

Linhagem: **C57Bl6**

N amostral: 122

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Camundongo geneticamente modificado (OGM)**

sexo: **Fêmeas**

Idade ou peso: **8 a 12 semanas**

Linhagem: **NLRP1b Knock out**

N amostral: 80

São Paulo, 19 de abril de 2022



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

À minha família.

Em especial Maria Clara e Joao Vitor.

AGRADECIMENTOS

Imenso agradecimento ao Prof Dr Niels Olsen Saraiva Camara por todo o suporte e compreensão durante esses mais de 4 anos e quem considero um grande exemplo de pessoa e de pesquisador.

Aos companheiro de laboratório, Meire, Omar, Bruno, Marcella, Thereza, Barbara, Mariana, Cris Naffah, Eloisa e Camila, por todas as ajudas com protocolos e sugestões, pelas conversas tomando café.

Também ao Professor Michael Heneka por ter aberto as portas do seu laboratório para mim em Bonn.

Aos colegas e amigos de laboratório que fiz na Alemanha, Paula, Frederik, Kishore, Dennis, Hannah, Sergio, Roisin e em especial Max e Charlotte.

Agradeço a CAPES pelo suporte e pela bolsa de pesquisa.

Agradeço ao DAAD pela bolsa de doutorado sanduiche na alemanha

“Then darkness took me, and I strayed out of thought and time, and I wandered far on roads that I will not tell. Naked I was sent back – for a brief time, until my task is done.” (JRR Tolkien. *The Lord of the Rings: The Two Towers*. 1954.)

RESUMO

Na doença de Alzheimer, há acúmulo extracelular de beta-amiloide (A β) em placas e agregação de proteína tau fosforilada em emaranhados neurofibrilares. Como células imunes residentes do sistema nervoso central, a micróglia e macrófagos são responsáveis pela depuração de A β através da fagocitose e podem orquestrar a resposta inflamatória associada a essa condição (1–4). A deleção do gene NLRP3 especificamente na micróglia demonstrou melhorar os sintomas cognitivos da doença de Alzheimer em camundongos, e, também, o perfil inflamatório, com redução de IL-1 β e IL-18 e de atividade da caspase-1 (3,5). Utilizando de uma estratégia de bloqueios farmacológicos e silenciamento genético, investigamos a ativação de NLRP1 e CARD8 em macrófagos e foi possível observar que a ativação de CARD8 em células THP-1 diferenciadas por PMA foi capaz de desencadear a produção de IL-1 β e aumentou a liberação de caspase-1 clivada e ASC no sobrenadante. O VbP também reduziu a proporção de células com mitocôndrias ativas e a menor respiração mitocondrial, e, curiosamente, isso foi associado à redução da fagocitose de A β . O silenciamento do inflamassoma CARD8 foi capaz de reverter os efeitos causados pelo tratamento com VbP, confirmando assim que a liberação de IL-1 β , a piroptose, a redução do metabolismo mitocondrial e capacidade fagocítica são resultados da ativação do inflamassoma CARD8. É possível concluir que em macrófagos a ativação do CARD8 é de importância para a função celular e pode ser um futuro alvo de terapias para a doença de Alzheimer.

Palavras chave: Inflamassomas. Fagocitose. Doença de Alzheimer. Ativação de Macrófagos. Encefalomielite Autoimune Experimental. Proteínas Adaptadoras de Sinalização CARD.

ABSTRACT

In Alzheimer's disease, there is extracellular accumulation of beta-amyloid (A β) in plaques and aggregation of phosphorylated tau protein in neurofibrillary tangles. As resident immune cells of the CNS, microglia and macrophages are responsible for A β clearance through phagocytosis and may orchestrate the inflammatory response associated with this condition (1–4). The deletion of the NLRP3 gene, specifically in microglia, has been shown to improve the cognitive symptoms of Alzheimer's disease in mice and the inflammatory profile, with a reduction of IL-1 β and IL-18, in addition to reducing the activity of caspase-1(3,5). Using a strategy of pharmacological blocks and genetic silencing, we investigated the activation of NLRP1 and CARD8 in macrophages, and it was possible to observe that the activation of CARD8 in THP-1 cells differentiated by PMA was able to trigger the production of IL-1 β and increased the release of cleaved caspase-1 and ASC into the supernatant. VbP also reduced the proportion of cells with active mitochondria, impaired mitochondrial respiration and, interestingly, this was associated with reduced A β phagocytosis. The silencing of the CARD8 inflammasome was able to reverse the effects caused by the treatment with VbP, thus confirming that the release of IL-1 β , pyroptosis and the reduction of mitochondrial metabolism and phagocytic capacity are the result of the activation of the CARD8 inflammasome. It is possible to conclude that in macrophages, the activation of CARD8 is important for cell function and may be a future target of therapies for Alzheimer's disease.

Key words: Inflammasomes. Phagocytosis. Alzheimer's disease. Encephalomyelitis, Autoimmune, Experimental. CARD Signaling Adaptor Proteins.