

**THAÍS BOCCIA DA COSTA**

**PAPEL DOS INFLAMASSOMAS NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS  
E NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA**

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Ramalho Bortoluci

Versão original

São Paulo  
2014

## RESUMO

da Costa TB. Papel dos inflamassomas na ativação de células dendríticas e modulação da resposta imune adaptativa. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A flagelina é um composto microbiano amplamente empregado pelo seu efeito adjuvante, entretanto os mecanismos pelos quais a flagelina exerce esse efeito ainda não estão completamente esclarecidos. O reconhecimento da flagelina pelos NLRs Naip5 e NLRC4 leva à formação do complexo multiproteico denominado inflamassoma que culmina na ativação da caspase-1, com consequente clivagem da forma inativa das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 e morte da célula infectada, o que poderia indicar um mecanismo de controle de patógenos. O papel do TLR5 na indução da resposta imune adaptativa pela flagelina já é conhecido, porém pouco se sabe a respeito da influência de Naip5 e NLRC4 nesse processo. Neste trabalho pudemos observar que *in vitro*, a maturação de BMDCs com a estimulação com flagelina citosólica, inserida em vesículas lipídicas que permitem a transfecção da flagelina para o citosol, foi independente da ativação de NLRC4, caspase-1 e TLR5, mas somente de MyD88. Já a ativação de linfócitos T por estas BMDCs ativadas por flagelina citosólica é parcialmente dependente de caspase-1 e totalmente dependente de MyD88. Nossos resultados sugerem a participação destas duas moléculas na montagem de resposta imune contra flagelina e indicam, também que a ativação de inflamassomas também pode contribuir para esse processo, pela produção de citocinas como a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A neutralização da citocina IL-1 $\alpha$ , levou à inibição da ativação de linfócitos T, indicando a contribuição desta para a montagem de resposta imune. A neutralização de IL-1 $\alpha$  também levou a uma redução na produção de IL-12, que seria a citocina responsável pela polarização dos linfócitos para Th1. A imunização com flagelina leva ao desenvolvimento de imunidade protetora contra o desafio com *S. typhimurium*, igualmente dependente de caspase-1 e MyD88. Até o presente momento, nossos resultados nos permitem dizer que a flagelina induz resposta imune tanto *in vivo* quanto *in vitro* e que, em ambos os casos, há a participação das moléculas caspase-1 e MyD88.

Palavras-chave: Flagelina. Caspase-1. MyD88. *S. typhimurium*. IL-1 $\alpha$ . Inflamassomas.

## ABSTRACT

da Costa TB. Role of inflammasome activation in the maturation of dendritic cells and in the development of adaptive immune response. [Ph. D thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Flagellin is a highly effective adjuvant for humoral and CD4 T cell responses used in several developing vaccines. It is recognized by TLR5 and by cytosolic NLRs members NAIP5/NLRC4. TLR5 activates inflammatory genes through MyD88 pathway whereas NLRC4 and NAIP5 assemble multiprotein complexes called inflammasomes, leading to caspase-1 activation and secretion of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. Despite the described adjuvant properties of flagellin, little is known about the mechanisms through which inflammasomes shape adaptive immune responses. Thus, we investigated the effects of inflammasome activation in dendritic cell maturation and T cell activation. Purified flagellin in its free form (FLA-BS) was able to stimulate BMDCs via TLR5 and MyD88. FLA-BS-stimulated BMDC pulsed with OVA also induces IFN- $\gamma$  production by OT-II splenocytes in a TLR5 and MyD88-dependent manner. Surprisingly, cytosolic flagellin (FLA-BSDot) induced upregulation of costimulatory molecules independent on TLR5, NLRC4 and Caspase-1, but dependent on MyD88. In addition, FLA-BSDot-stimulated OVA-pulsed BMDCs induced proliferation and production of IFN- $\gamma$  by OT-II splenocytes, dependent on caspase-1 and MyD88. FLA-BSDot stimulation leads to the secretion of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$ , both cytokines that act on IL-1R1 and recruit MyD88. To verify the factor responsible for the Th1 polarization in response to FLA-BSDot, we used neutralizing antibodies for IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Neutralization of IL-1 $\alpha$  but not IL-1 $\beta$ , inhibited BMDCs maturation in response to FLA-BSDot and led to decreased IFN- $\gamma$  production by OT-II splenocytes. Searching for the effector mechanism by which IL-1 $\alpha$  induces Th1 polarization in response to FLA-BSDot, we observed a significant reduction in IL-12 production when IL-1 $\alpha$  was neutralized, which could interfere with IFN- $\gamma$  production by OT-II splenocytes. Also, we could see that adaptive immune responses induced by flagellin *in vivo* was protective against *S.typhimurium* lethal challenge, showing again a role for caspase-1 and MyD88. From these data we can infer that caspase-1 and MyD88 are both involved in the adaptive response induced by flagellin both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Flagellin. Caspase-1. MyD88. *S. typhimurium*. IL-1 $\alpha$ . Inflammasomes.

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um sistema de reconhecimento molecular que tem como função a manutenção da homeostasia, em situações infecciosas ou fisiológicas. O sistema é composto pela imunidade inata, que, em última instância, é responsável pelo controle inicial de uma infecção, além de gerar condições propícias para que a imunidade adquirida seja gerada. A imunidade adquirida, por sua vez, tem o papel ativo de eliminar a infecção de modo específico envolvendo células e anticorpos produzidos em resposta específica ao micro-organismo em questão.

Fazem parte da imunidade inata, vários tipos celulares, dentre eles as células dendríticas (DCs) que são imprescindíveis para o desenvolvimento da resposta imunológica. As DCs são responsáveis pela captura, processamento e apresentação de antígenos para células da imunidade adquirida, os linfócitos T. Sendo assim, as DCs são chamadas de APCs (do inglês *antigen presenting cells*) profissionais e são especializadas nos processos que envolvem a ativação dos linfócitos T (1, 2).

A etapa inicial para ativação das DCs é a discriminação entre padrões moleculares de agentes exógenos e danos celulares, de estruturas próprias preservadas. Alguns mecanismos fazem parte dessa distinção como o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs do inglês *pathogen associated molecular patterns*) por receptores específicos (PRRs do inglês *pathogen recognition receptors*) (3, 4). Dentre os PRRs, destacam-se os receptores do tipo Toll (do inglês, *toll like receptors*, TLR) que são proteínas transmembrânicas com ectodomínios contendo regiões ricas em leucina, pelas quais ocorre o reconhecimento dos PAMPs; um domínio transmembrânico e um domínio intracelular, semelhante ao domínio intracelular do receptor para IL-1, e responsável pela transdução do sinal para dentro da célula.

Até hoje foram descritos treze tipos de TLR, sendo onze em humanos e treze em camundongos. Cada TLR possui uma função distinta no reconhecimento dos PAMPs e direcionamento da resposta imune (3). Entre os ligantes de TLR estão peptídeo-glicanas e lipoproteínas bacterianas, glicofosfatidil inositol (GPI) presente em protozoários e zimozan encontrado em fungos, todos reconhecidos por TLR2,

RNA dupla-fita encontrado em vírus, reconhecido por TLR3, lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram negativas e reconhecido por TLR4, flagelina, componente do flagelo de bactérias móveis e reconhecida por TLR5 e sequências de DNA ricas em sequências CpG não metiladas, encontradas em vírus e bactérias e reconhecidas por TLR9 (5). A ativação de TLRs por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas como MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor like/TIR-associated protein*), TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*), TRAM (*Toll-receptor-associated molecule*) ou SARM (*Sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif containing protein*) (6). Essa cascata de sinalização culmina na ativação de fatores de transcrição como o NF $\kappa$ B e IRFs (*Interferon responsive factors*) e na liberação de citocinas pró-inflamatórias (7).

Após a descoberta dos TLRs, diversos tipos de PRR citosólicos foram identificados, como os RLRs e NLRs (do inglês, *RIG-like receptors* e *Nod-like receptors*, respectivamente). A família dos RLRs possui três membros, RIG-I, Mda5 e LGP2 que reconhecem RNA viral (8). A família dos NLRs ou NLR-LRR (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain - leucine rich repeats*) possui mais de vinte membros e vários deles reconhecem diversos PAMPs e fatores de dano celular, (DAMPs do inglês *danger associated molecular patterns*) (9). A família dos NLRs pode ser subdividida nas subfamílias NOD, NLRCs (NLR-CARD (*caspase activation and recruitment domain*) containing); NLRPs (NLR- PYD (*pyrin domain*) containing) e NAIPs, que contêm o domínio CARD e os que contêm o domínio PYD. O domínio CARD permite a ligação e ativação da caspase-1 e da serina-treonina kinase RIP2, enquanto o domínio PYD é responsável pela ligação e ativação de proteínas adaptadoras que recrutam caspase-1 (10-12).

Os NLRs NLRP1, NLRP2, NLRP3 e NLRC4 (também chamado IPAF do inglês ICE protease-activating factor) são capazes de formar complexos de alto peso molecular, chamados inflamassomas, que ativam a caspase-1 e induzem a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 pela célula em questão (12). Alguns NLRs não possuem o domínio CARD para recrutar e ativar a caspase-1 e para esse fim, utilizam proteínas adaptadoras como a ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) que contem ambos os domínios PYD e CARD. Apesar de, em alguns casos, a ação

conjunta de NLRs e moléculas adaptadoras como a ASC ser requerida para algumas funções do NLRP1 e inflamassoma NLRC4, estes podem interagir diretamente com a caspase-1, pois ambos possuem domínio CARD e não necessitariam do auxílio da molécula adaptadora ASC para recrutar e ativar caspase-1 (12, 13).

A formação de inflamassomas é induzida a partir de diversos estímulos, como: dano à membrana plasmática, toxinas formadoras de poros e a presença de produtos microbianos que agem como PAMPs. A ativação do inflamassoma leva à liberação de IL-1 $\beta$  que é induzida pela ação conjunta de TLRs e NLRs, que induzem a transcrição de pró-IL-1 $\beta$  e liberação da citocina na sua forma ativa, respectivamente (14, 15). Devido à grande importância da IL-1 $\beta$  na inflamação, os inflamassomas foram indicados como sensores para danos celulares causados por bactérias ou para as bactérias em si, encontradas em compartimentos intracelulares e não expostas a receptores da resposta imune inata (16).

Apesar de apresentarem respostas distintas, TLR e NLR parecem compartilhar ligantes. A flagelina é uma proteína que faz parte de uma subunidade do flagelo de bactérias móveis, e, no espaço extracelular, é reconhecida por TLR5 (17). Ainda, a flagelina pode ser encontrada no citosol, levada por sistemas de transporte, como o sistema de secreção tipo III (SPI-1 T3SS de *Salmonella*) e tipo IV (T4SS de *Legionella*), encontrados em bactérias virulentas. Uma vez no citosol, a flagelina pode ser reconhecida pelos NLRs NAIP5 que recruta NLRC4 e inicia a formação do inflamassoma, levando à ativação de caspase-1 com consequente liberação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-18 e morte da célula em questão (18-22), secreção de mediadores lipídicos (23), regulação de autofagia (24) e ativação de iNOS, demonstrado pelo nosso grupo (25), entre outros mecanismos efetores. A morte celular induzida pela ativação de caspase-1 vem sendo relacionada a mecanismos de controle de patógenos, como controle da replicação de *Legionella pneumophila* (26) e *Salmonella typhimurium*, independente da produção de IL-1 $\beta$  e IL-18, uma vez que a morte inflamatória leva à remoção do patógeno dos tecidos adjacentes por neutrófilos (27).

Como a ativação de NLRs é capaz de induzir uma forma de morte pró inflamatória, surge a dúvida de como o sistema imune consegue discriminar entre

diferentes tipos de morte celular, ou como a morte celular pode modular a resposta imune. Para isso, duas abordagens são utilizadas: estudar os sinais emitidos por células em processo de morte e as consequências dos diferentes tipos de morte. Uma das teorias sugeridas diz que o reconhecimento de PAMPs é suficiente para determinar se a morte celular é silenciosa, na ausência de patógenos ou se é imunogênica, com a presença de patógenos (28). Entretanto, simplesmente a presença ou não de PAMPs pode não ser o único critério para determinar se a morte será imunogênica ou não, uma vez que há a chamada inflamação estéril que pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes, indicando que células que morrem de formas distintas podem sim estimular o sistema imune (29). Com isso, foi proposta a teoria de DAMPs para explicar o potencial imunogênico de células em processo de morte ou estresse.

Os DAMPs são liberados por células em processo de morte e são capazes de induzir resposta imune contra antígenos celulares, sejam essas células tumorais, tecido autólogo ou células infectadas por patógenos. Para que a morte celular seja imunogênica, é preciso que haja a liberação de DAMPs e consequente ativação de células do sistema imune (30). A segunda teoria sugerida diz que tipos de morte celular distintos induzem tipos distintos de resposta imune, sendo a apoptose uma morte intrinsecamente tolerogênica e a necrose altamente imunogênica e capaz de induzir processos inflamatórios (31). Contudo, já foi demonstrada a capacidade de células apoptóticas em induzir inflamação, quando comparadas a células em necrose (32, 33), e com isso, a ideia proposta foi de que há diferentes subtipos de morte celular e que diferenças sutis na composição das substâncias presentes na superfície das células e os produtos liberados, incluindo DAMPs, determinam se a morte celular é imunogênica ou não (34).

No caso da piroptose, essa morte vêm sendo relacionada à liberação não apenas das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18, mas também de DAMPs, como por exemplo, HMGB1 (do inglês *high mobility group box 1*) e a alarmina IL-1 $\alpha$ . HMGB1 é uma proteína de 25kDa, expressa constitutivamente, altamente conservada evolutivamente e com 98% de homologia entre os mamíferos (35). Sua função principal é estabilizar a estrutura da cromatina e modular a transcrição gênica por auxiliar no processo de dobramento da molécula do DNA (36), mas também está

presente no citoplasma, sugerindo que esta proteína possa ter outras funções fora do núcleo (37). Estudos mais antigos revelam que a morte de células por apoptose impede a liberação de HMGB1, mais um fato que faz com que este tipo de morte celular seja tolerogênico (38, 39). Apesar de ser liberado passivamente por células mortas com membrana danificadas, estudos recentes vêm atribuindo um papel para os inflamassomas na secreção desse fator. A inibição farmacológica de caspase-1 reduz a liberação de HMGB1 durante o choque séptico, aumentando a sobrevivência dos animais. *In vitro*, em cultura de macrófagos, a inibição não específica de caspases diminui a liberação desta molécula, indicando que células do sistema imune liberam ativamente HMGB1 de maneira caspase dependente (40). Recentemente, outros trabalhos mostraram a liberação de HMGB1, em resposta à ativação de inflamassomas por vários estímulos (41, 42). Outro fato importante é que em animais deficientes para as proteínas do inflamassoma, a liberação de HMGB1 é drasticamente reduzida durante o choque séptico (41, 42).

A citocina IL-1 foi descrita inicialmente como uma proteína que era capaz de induzir febre e foi chamada de *human leukocyte pyrogen* (43). Pouco tempo depois foram descobertos 2 tipos de IL-1 que conhecemos hoje como IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (44). A citocina IL-1 é produzida por vários tipos celulares incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos, microglia, neutrófilos, DCs entre outras, juntamente com o receptor para IL-1. A forma pró de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  é produzida em resposta a ativação de TLRs e possui atividades distintas. A forma pró da IL-1 $\alpha$  já é capaz de se ligar ao receptor e exercer suas ações pró-inflamatórias. Já a IL-1 $\beta$  não é capaz de se ligar a IL-1R1 na forma pró, e requer processamento pela caspase-1 para tornar-se ativa (45). A pró IL-1 $\alpha$  pode ser processada pela enzima calpaína, mas os efeitos desta clivagem ainda não foram totalmente elucidados (46). A IL-1 tem papel importante no sistema imune inato e também é capaz de modular funções da imunidade adaptativa. Ambas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são potentes moléculas pró inflamatórias e têm diversos efeitos na proliferação, diferenciação e função de células da imunidade adaptativa ou inata (47). A sinalização de IL-1 $\beta$  induz a diferenciação de células T CD4 para Th17 (48), que por sua vez pode ser regulada pela expressão diferencial de IL-1R1, controlada por IL-7 e IL-15 (49). A estimulação de células T com IL-1 $\beta$  e IL-23



leva à produção de IL-17 (50) e essa IL-17 pode ter papel no desenvolvimento de várias doenças autoimunes como artrite reumatoide, esclerose múltipla, lúpus entre outras (51).

Assim como o HMGB1, foi sugerido que a liberação de IL-1 $\alpha$  envolve a ativação de inflamassomas. O trabalho de Gross et al. (2012) (52) mostrou que a ativação de inflamassomas leva à liberação de IL-1 $\alpha$ , mas em células de animais deficientes em caspase-1 a liberação de IL-1 $\alpha$  é diminuída, mas estes resultados foram observados apenas com a estimulação de NLRP3, NLRP1 e AIM2. Estes resultados demonstram que a ação dos inflamassomas não está totalmente elucidada, faltando ainda dados sobre o seu mecanismo de ação na liberação destes e outros DAMPs e a sua influência na montagem da resposta imune.

Os TLRs são muito estudados quanto à sua capacidade de induzir resposta imune inata e adaptativa. Estes receptores são responsáveis pela indução de respostas diversas incluindo produção de anticorpos de várias classes como IgM, IgG e IgA, respostas de células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 e Th17 e também T CD8<sup>+</sup> (53). Sporri e Reis e Sousa (2005) (54) mostraram que DCs podem ser ativadas via citocinas, na ausência de ligantes de TLRs, mas estas DCs são incapazes de induzir diferenciação de linfócitos T. Trabalhando com DCs ativadas diretamente via TLRs ou via citocinas, este trabalho consegue evidenciar a importância do reconhecimento dos PAMPs não somente para imunidade inata, mas principalmente para o desenvolvimento da imunidade adquirida. Ainda, o reconhecimento de PAMPs pelos TLRs, é necessário para que haja a apresentação de antígenos. O conteúdo dos fagolisossomos só é apresentado via MHC II, se houver algum ligante de TLR associado aos antígenos, e na ausência de ligantes de TLRs não há geração de complexos MHC II-peptídeo (55). Entretanto, Já foi demonstrado que animais *knockouts* para as proteínas MyD88 e TRIF, responsáveis pela sinalização dos TLRs, apresentam imunidade adaptativa inalterada a antígenos T-específicos administrados juntamente com adjuvantes (56, 57). Estes resultados sugerem a participação de outras moléculas, que não os TLR, na montagem da resposta imune adaptativa.

Apesar dos TLRs serem os PRRs mais estudados, a maior parte dos PRRs que ativam os fatores de transcrição NF $\kappa$ B, NFAT e IRFs, é capaz de induzir resposta

adaptativa (58). Entre os PRRs que ativam esses fatores de transcrição estão NOD1 e NOD2. E, apesar de os inflamassomas não envolverem diretamente a ativação de NF $\kappa$ B, NFAT e IRFs, esses complexos também estão envolvidos no desenvolvimento de resposta imune adaptativa.

A flagelina é capaz de induzir resposta imune adaptativa, sendo amplamente utilizada como adjuvante em diversos estudos com vacinas. A ação da flagelina sobre as DCs já foi descrita, apesar dos relatos encontrados serem divergentes. Enquanto alguns trabalhos demonstram a modulação de moléculas co-estimuladoras em DCs humanas (59-62), em camundongos os dados presentes na literatura são controversos. Em BMDCs (do inglês, *bone marrow-derived dendritic cells*) de camundongos C3H/HeJ, a flagelina purificada de *Salmonella typhimurium* é capaz de aumentar a expressão de MHC II, CD86, CD80 e CD40 (63), mas em BMDCs de camundongos da linhagem C57BL/6, esta modulação das moléculas co-estimuladoras não é observada (60, 64) e também não há aumento de produção de IL-6, uma citocina pró-inflamatória produzida por DCs ativadas com outros ligantes de TLRs como o LPS e CpG (64). Já a administração de flagelina *in vivo* resulta em grande modulação das moléculas co-estimuladoras em DCs esplênicas (63, 65, 66) e esta ativação é dependente de MyD88 e TLR5 (63, 65, 67).

A capacidade da flagelina em induzir resposta imune adaptativa foi avaliada em modelos utilizando células de animais OT-II para determinar a capacidade adjuvante deste composto microbiano, gerando resposta contra a proteína OVA. A imunização de animais C57BL/6 com flagelina e OVA conseguiu induzir a ativação e proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e este fenômeno se mostrou dependente de TLR5 e MyD88 (64). Ainda a capacidade das DCs em induzir a ativação e proliferação de células T CD4<sup>+</sup> se mostrou parcialmente dependente da expressão de TLR5 nas DCs, uma vez que a transferência de DCs TLR5<sup>-/-</sup> para um animal CD11c DTR depletado de DCs, reduziu, mas não aboliu a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em comparação ao animal que recebeu DCs TLR5<sup>+/+</sup> (64). A flagelina também induz resposta contra a própria proteína, e dados publicados por Cunningham et al. (2004) (68) e Bobat et al. (2011) (69) demonstram a indução de resposta do tipo Th2 com produção de IL-4 após administração de flagelina *in vivo*. Sendo um componente da bactéria *S. typhimurium*, o desafio com a bactéria, em animais previamente imunizados com

flagelina, leva à produção de IFN- $\gamma$  e indução de padrão de resposta Th1, com melhor controle da infecção (69).

Há escassos estudos envolvendo o inflamassoma NAIP5/NLRC4 na indução da resposta adaptativa à flagelina. O trabalho de Kupz et al. (2011) (70) mostra a ativação de células T CD8 não específicas para flagelina durante a infecção com *S. typhimurium*. Esta ativação se dá pela sinalização de IL-18 nas células CD8, induzida pela produção desta por DCs infectadas. Ainda, Naip5/NLRC4 exerce um papel redundante com TLR5 na indução da produção de anticorpos contra a flagelina ou contra a OVA co-administrada (65, 71), provavelmente pelo fato deste componente bacteriano ser reconhecido também pelos NLRs NLRC4 e Naip5, indicando mais uma vez, que os NLRs podem ter papel importante na indução da resposta imune adaptativa. Uma vez que a flagelina é capaz de induzir resposta imune adaptativa via TLRs e NLRs, nossa proposta principal foi identificar a importância do inflamassoma Naip5/NLRC4 para a modulação do perfil de diferenciação de linfócitos T ativados por DCs estimuladas com flagelina citosólica ou livre e também em modelos de imunização com flagelina purificada.

## 2 CONCLUSÕES

- A flagelina citosólica induziu aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e secreção de IL-1 $\alpha$  por DCs de maneira independente de TLR5 e NLRC4. Esses efeitos foram reduzidos na ausência de caspase-1 e abolidos na ausência de MyD88.
- A ausência de IL-1 $\beta$  e, especialmente, IL-1R e IL-1 $\alpha$  reduziu a produção de IL-12 por DCs estimuladas com flagelina citosólica e a produção de IFN-g por esplenócitos de animais OTII em co-cultura com essas DCs.
- A produção de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  foi alterada na presença de inibidores farmacológicos para catepsina B, sugerindo o envolvimento da via lisossomal induzida por flagelina citosólica nesses efeitos.
- A imunização prévia de animais com flagelina aumentou a sobrevivência dos mesmos contra o desafio com *S. typhimurium*, sendo que camundongos caspase-1<sup>-/-</sup> e MyD88<sup>-/-</sup> apresentaram as taxas mais precoces de mortalidade.

## REFERÊNCIAS

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
2. Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*. 1999 Feb 15;189(4):611-4.
3. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. [Review]. 2002;20:197-216.
4. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May;117(5):979-87; quiz 88.
5. Akira S, Hoshino K, Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res*. 2000;6(5):383-7.
6. Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2011 Dec;7(12):e1002379.
7. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. [Review]. 2007 Nov;13(11):460-9.
8. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*. 2006 Oct;7(10):1074-81.
9. Yamamoto M, Akira S. [TIR domain--containing adaptors regulate TLR-mediated signaling pathways]. *Nihon Rinsho*. [Review]. 2004 Dec;62(12):2197-203.
10. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol*. [Review]. 2010 Jan;20(1):4-22.
11. Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*. 2009 Jan;227(1):106-28.
12. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*. [Review]. 2003 May;3(5):371-82.
13. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:447-80.

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

14. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol.* 2006 Dec;7(12):1250-7.
15. Kufer TA. Signal transduction pathways used by NLR-type innate immune receptors. *Mol Biosyst.* 2008 May;4(5):380-6.
16. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* 2006 Jun;7(6):576-82.
17. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* . 2010 Mar 19;140(6):821-32.
18. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* [Review]. 2009;27:229-65.
19. O'Connor W, Jr., Harton JA, Zhu X, Linhoff MW, Ting JP. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6329-33.
20. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):787-91.
21. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol.* . 2011 Feb;12(2):121-8.
22. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* . 2001 Apr 26;410(6832):1099-103.
23. Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, Brady G, et al. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem.* . 2006 Nov 17;281(46):35217-23.
24. Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci.* . 2010 May;67(10):1643-51.
25. Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, et al. A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *J Biol Chem.* 2010 Oct 15;285(42):32087-95.
26. Ren T, Zamboni DS, Roy CR, Dietrich WF, Vance RE. Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog.* . 2006 Mar;2(3):e18.

27. Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol.* . 2006 Mar;7(3):318-25.
28. Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NALPs determines inflammasome specificity. *Nature.* . 2011 Sep 29;477(7366):592-5.
29. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature.* . 2011 Sep 29;477(7366):596-600.
30. Miao EA, Warren SE. Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *J Clin Immunol.* 2010 Jul;30(4):502-6.
31. Akhter A, Gavrillin MA, Frantz L, Washington S, Ditty C, Limoli D, et al. Caspase-7 activation by the Nlrc4/Ipaf inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathog.* . 2009 Apr;5(4):e1000361.
32. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* . 2010 Dec;11(12):1136-42.
33. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J Exp Med.* . 2010 Aug 2;207(8):1745-55.
34. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* . 2002 Apr 12;296(5566):298-300.
35. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):301-5.
36. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol.* . 2009 May;9(5):353-63.
37. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* [Review]. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62.
38. Zitvogel L, Casares N, Pequignot MO, Chaput N, Albert ML, Kroemer G. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol.* . 2004;84:131-79.
39. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* . 2005 Dec 19;202(12):1691-701.
40. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* . 2007 Oct;14(10):1848-50.

41. Muller S, Bianchi ME, Knapp S. Thermodynamics of HMGB1 interaction with duplex DNA. *Biochemistry*. . 2001 Aug 28;40(34):10254-61.
42. Javaherian K, Liu JF, Wang JC. Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 change the DNA helical structure. *Science*. . 1978 Mar 24;199(4335):1345-6.
43. Bustin M, Neihart NK. Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells. *Cell*. 1979 Jan;16(1):181-9.
44. Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*. . 2006 Jul 10;203(7):1637-42.
45. Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, Brickey WJ, Huang MT, Taxman DJ, et al. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates *in vivo* caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. . 2009 Aug 1;183(3):2008-15.
46. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol*. . 2010 Oct 1;185(7):4385-92.
47. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P, et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature*. . 2012 Aug 30;488(7413):670-4.
48. Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity*. . 2008 Jul 18;29(1):21-32.
49. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. . 2002 Jul 11;418(6894):191-5.
50. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. . 2010;28:321-42.
51. Dinarello CA, Renfer L, Wolff SM. Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Oct;74(10):4624-7.
52. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*. . 1993 Jan 14;328(2):106-13.
53. Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, et al. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem*. [Comparative Study]. 1987 Mar 5;262(7):2941-4.



54. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. . 1996 Mar 15;87(6):2095-147.
55. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. . 2007 Sep;8(9):942-9.
56. Lee WW, Kang SW, Choi J, Lee SH, Shah K, Eynon EE, et al. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood*. . 2010 Jan 21;115(3):530-40.
57. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. . 2009 Aug 21;31(2):331-41.
58. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. [Review]. 2009 May;123(5):1004-11.
59. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, et al. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*. . 2012 Mar 23;36(3):388-400.
60. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):4984-9.
61. Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol*. . 2003 May 15;170(10):5165-75.
62. Merlo A, Calcaterra C, Menard S, Balsari A. Cross-talk between toll-like receptors 5 and 9 on activation of human immune responses. *J Leukoc Biol*. . 2007 Sep;82(3):509-18.
63. Arimilli S, Johnson JB, Clark KM, Graff AH, Alexander-Miller MA, Mizel SB, et al. Engineered expression of the TLR5 ligand flagellin enhances paramyxovirus activation of human dendritic cell function. *J Virol*. . 2008 Nov;82(22):10975-85.
64. Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol*. . 2004 Jun 1;172(11):6922-30.

65. Bates JT, Uematsu S, Akira S, Mizel SB. Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J Immunol.* . 2009 Jun 15;182(12):7539-47.
66. Tsujimoto H, Uchida T, Efron PA, Scumpia PO, Verma A, Matsumoto T, et al. Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. *J Leukoc Biol.* 2005 Oct;78(4):888-97.
67. Sanders CJ, Franchi L, Yarovinsky F, Uematsu S, Akira S, Nunez G, et al. Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. *Eur J Immunol.* . 2009 Feb;39(2):359-71.
68. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galan JE, et al. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* . 2006 Aug 15;103(33):12487-92.
69. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004 Oct;5(10):987-95.
70. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.* . 2005 Feb;6(2):163-70.
71. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* . 2006 Apr 6;440(7085):808-12.
72. Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science.* . 2006 Dec 22;314(5807):1936-8.
73. Nemazee D, Gavin A, Hoebe K, Beutler B. Immunology: Toll-like receptors and antibody responses. *Nature.* [Comment]. 2006 May 18;441(7091):E4; discussion E.
74. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* . 2009 Jan;227(1):221-33.
75. Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol.* . 2009 Oct;10(10):1073-80.
76. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med.* . 2009 Jan 16;206(1):79-87.

77. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. . 2007 Apr;26(4):445-59.
78. Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P, et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. . 2010 Jul 15;185(2):974-81.
79. Cunningham AF, Khan M, Ball J, Toellner KM, Serre K, Mohr E, et al. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. *Eur J Immunol*. . 2004 Nov;34(11):2986-95.
80. Bobat S, Flores-Langarica A, Hitchcock J, Marshall JL, Kingsley RA, Goodall M, et al. Soluble flagellin, FliC, induces an Ag-specific Th2 response, yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of Salmonella typhimurium infection. *Eur J Immunol*. . 2011 Jun;41(6):1606-18.
81. Vijay-Kumar M, Carvalho FA, Aitken JD, Fidadara NH, Gewirtz AT. TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *Eur J Immunol*. . 2010 Dec;40(12):3528-34.
82. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. . 1992 Dec 1;176(6):1693-702.
83. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, et al. Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. . 2010 Feb 9;107(6):2574-9.
84. Broz P, Ruby T, Belhocine K, Bouley DM, Kayagaki N, Dixit VM, et al. Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. *Nature*. . 2012 Oct 11;490(7419):288-91.
85. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011 Nov 3;479(7371):117-21.
86. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*. 2013 Sep 13;341(6151):1246-9.
87. Kenneth NS, Younger JM, Hughes ED, Marcotte D, Barker PA, Saunders TL, et al. An inactivating caspase 11 passenger mutation originating from the 129 murine strain in mice targeted for c-IAP1. *Biochem J*. . 2012 Apr 15;443(2):355-9.

88. Lage SL, Buzzo CL, Amaral EP, Matteucci KC, Massis LM, Icimoto MY, et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. . 2013 Aug 27;110(35):E3321-30.
89. Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol*. . 2008 Aug;38(8):2085-9.
90. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181(6):3755-9.
91. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol*. . 2008 Jul 1;181(1):17-21.
92. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. . 2006 Mar;24(3):317-27.
93. Watanabe H, Gaide O, Petrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, et al. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. . 2007 Aug;127(8):1956-63.
94. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*. . 2009 May 21;459(7245):433-6.