

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARLA FREITAS

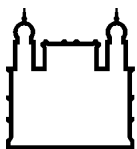
**Envolvimento de receptores da resposta imune inata e dos inflamassomos na
biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante infecção por *Mycobacterium
bovis* BCG**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Patrícia Torres Bozza

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARLA FREITAS

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES DA RESPOSTA IMUNE INATA E DOS
INFLAMASSOMOS NA BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS
DURANTE INFECCÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG**

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Patrícia Torres Bozza

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani - **Presidente**
Prof. Dr. Robson Coutinho Silva
Prof. Dr^a. Maria Cristina Maciel Plotkowski
Prof. Dr^a. Letícia de Albuquerque Maranhão Carneiro - **Revisora e suplente**
Prof. Dr. Luiz Anastácio Alves - **Suplente**

Rio de Janeiro, 02 de Junho de 2014.

À minha mãe, dedico, não só esta tese,
mas toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Patrícia Bozza, por ter aceitado me orientar durante esses anos, e por ter estado comigo no momento mais difícil desta tese. Quando nada parecia dar certo, o cansaço e o desânimo eram dominantes, ela soube perceber isso e me dar ferramentas para continuar. Foi uma honra ser sua aluna e fazer parte deste grupo sólido e respeitado que você construiu.

À minha família, que mesmo sem entender direito de que se trata essa carreira científica, compreendia minha ausência e minhas ocupações e sempre torceu por mim.

Aos amigos que fiz no lab imunofar. Todos sabem o quanto gosto do clima do lab, apesar dos problemas diários, que estão presentes em qualquer outro lugar do mundo. Foi um prazer estar com vocês e dividirmos as agruras e alegrias da vida científica. Em especial, agradeço à Juliana Lopes, que esteve comigo em todos os momentos, os ruins e os bons. Você, Ju: "me agrega muito".

Também um agradecimento especial à amiga Narayana Fazolini, pela simpatia de pessoa, sempre disposta a ajudar, desde que entrei no lab, e ouvir meus dilemas com uma opinião super relevante e útil.

Ao meu filhote, aluno de iniciação científica, Vinícius Guerra. Muito obrigada por permitir que eu seja sua iniciadora científica. Acompanhar o seu crescimento profissional e pessoal me orgulha muito. Tenho certeza que você vai longe.

Aos amigos do Hospital Federal de Bonsucesso, Anderson Viana, que me apoiou e foi meu braço direito durante boa parte dessa tese e, Márcio Bandeira, que esteve comigo na pior parte, no final, quando todos os problemas pessoais e profissionais se somaram, ele me emprestou o ombro para chorar e os ouvidos para escutar minhas lamentações. Ainda bem que agora "o copo está cheio".

Aos amigos que fiz ao longo da vida, que entenderam minha distância e tornavam nossos encontros em momentos muito especiais, principalmente elas: Natale Figueiredo, Juliana Correa, Suellen Cardoso, Ana Paula Santos, Carla Soares, Joyce Gonçalves.

Não posso deixar de agradecer a quem esteve presente durante a maior parte da minha vida científica, me dando apoio, carinho, estímulo, amor. Igor, foi muito bom enquanto durou.

Aos colaboradores do lab e de outros lugares. Agradeço à Rose Rodrigues, pelo apoio burocrático; Edson Assis pelos EIAs; Alan Carneiro pelos ensinamentos de western blotting; Fabianno Ferreira e Kelly Magalhães pela ajuda com os inibidores e ativadores de inflamassomos; Leonardo Braga pela ajuda com os receptores purinérgicos; ao laboratório do CNRS/Orléans, pela recepção e disponibilidade.

Por fim, agradeço às agências de fomento, CNPq, Faperj, Capes pelo apoio financeiro.

A todos vocês, **MUITO OBRIGADA!!**

*"Coisas são semelhantes.
Por isso a ciência é possível.
Coisas são diferentes.
Por isso a ciência é necessária."*

Richard Lewontin, 1983.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADRP: *adipose differentiation-related protein*
- AP-1: *activating protein-1*
- ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
- ATG: *autophagy-related genes*
- ATGL: *adipose triglyceride lipase*
- ATP: *adenosina trifosfato*
- BBG: *remazol brilliant blue*
- BCG: *bacilo Calmette-Guerin*
- BIR: *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*
- BMM: *bone marrow medium*
- BSA: *bovine serum albumin*
- CARD: *caspase activation and recruitment domains*
- CD: *cluster of differentiation*
- CL: *corpúsculo lipídico*
- COP: *CARD only proteins*
- COX2: *ciclooxigenase 2*
- DAMP: *damage-associated molecular pattern molecules*
- DAP: *diaminopimelic acid*
- DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DC-SIGN: *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*
- DNA: *ácido desoxirribonucléico*
- EDTA: *ethylenediamine tetraacetic acid*
- EGTA: *ethylene glycol tetraacetic acid*
- EIA: *enzyme immunoassay*
- ELISA: *enzyme linked immuno sorbent assay*
- ERK: *extracellular-signal-regulated kinases*
- FACS: *fluorescence activated cell sorter*
- FAS: *fatty acid synthase*
- GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- HETE: *hydroxyeicosatetraenoic acid*
- HMGB-1: *high-mobility group box 1 protein*

HSL: *hormone-sensitive lipase*
ICE: *interleukin-1 β -converting enzyme*
IFN: *interferon*
Ig: *imunoglobulina*
IKK: *I κ B kinase*
IL: *interleucina*
IRAK: *interleukin-1 receptor-associated kinase*
IRF3: *interferon regulatory transcription factor*
JNK: *c-Jun N-terminal kinase*
KC: *keratinocyte-derived chemokine*
LAM: *lipoarabinomannan*
LDH: *lactato desidrogenase*
LDL: *low density lipoprotein*
LM: *lipomannan*
LPS: *lipopolysaccharide*
LRR: *leucine-rich repeat*
LT: *leukotriene*
MAPK: *mitogen-activated protein kinases*
MCP-1: *monocyte chemotactic protein-1*
M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor*
MDP: *muramyl dipeptide*
MIP-2: *macrophage inflammatory protein 2*
MOI: *multiplicity of infection*
MyD88: *myeloid differentiation primary response gene 88*
mRNA: *ribonucleic acid*
NACHT: *central nucleotide-binding domain*
NF- κ B: *nuclear factor κ B*
NK: *natural killer*
NLR: *nod- like receptor*
NO: *nitric oxide*
NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*
PAF: *platelet-activating factor*
PAMP: *pathogen-associated molecular pattern*
PBS: *phosphate buffered saline*
PG: *prostaglandin*

PGN: *peptidoglycan*
PIM: *phosphatidylinositol mannoside*
PKA: *protein kinase A*
PKC: *protein kinase C*
POP: *PYD only protein*
PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptors*
PRR: *pattern recognition receptors*
PYD: *pyrin domain*
RANTES: *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*
RE: *retículo endoplasmático*
RIG: *retinoic acid-inducible gene 1*
RIP/RICK: *receptor-interacting protein-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase*
SEM: *standard error medium*
SFB: *soro fetal bovino*
TAB: *TAK1-binding proteins*
TAK1: *transforming growth factor β activated kinase-1*
TBK1: *TANK-binding kinase 1*
TBS: *tris buffered saline*
TBS-T: *tris buffered saline-tween*
TCA: *trichloroacetic acid*
TCH: *thiocarbohidrazida*
TEE: *tampão tris-EDTA-EGTA*
TGF: *transforming growth factor*
TIP: *tail-interacting protein*
TIR: *toll/interleukin-1 receptor*
TLR: *toll-like receptor*
TNF: *tumoral necrosis factor*
TRAF6: *TNF receptor associated factor*
TRIF: *TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta*
UFC: *unidade formadora de colônia*
WT: *wild-type*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

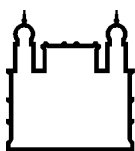
Figura 1: Representação esquemática da estrutura e das principais vias de ativação dos PRRs.....	2
Figura 2: Exemplos de patógenos expressando ligantes para múltiplos TLRs.....	4
Figura 3: Estrutura dos NLRs	6
Figura 4: Ativação de NLRs por bactérias, PAMPs e DAMPs.....	7
Figura 5: Vias de sinalização desencadeadas por Nod1 e Nod2.....	9
Figura 6: Esquema de estrutura básica de um inflamassomo.....	11
Figura 7: Moléculas de patógenos (PAMPs) ou do hospedeiro ou do ambiente (DAMPs) na ativação de inflamassomos.....	12
Figura 8: IL-1 β é somente a ponta do ICEberg?.....	14
Figura 9: Mecanismos efetores de caspase-1.....	15
Figura 10: Ativação do inflamassomo NLRP3.....	17
Figura 11: Corpúsculos lipídicos em macrófagos marcados com a sonda fluorescente verde Bodipy.....	20
Figura 12: Proteínas que podem estar associadas aos corpúsculos lipídicos.....	23
Figura 13: Participação de receptores da imunidade inata no reconhecimento de micobactérias em macrófagos.....	27
Figura 14: Desenho esquemático dos objetivos propostos para a primeira parte da tese.....	29
Figura 15: Desenho esquemático dos objetivos propostos para a segunda parte da tese.....	30
Figura 16: Esquema de fracionamento subcelular após ultracentrifugação em gradiente de sacarose.....	35
Figura 17: Cinética de formação de corpúsculos lipídicos e secreção de IL-1 β , após infecção por BCG.....	39
Figura 18: Expressão de IL-1 β intracelular.....	40
Figura 19: Avaliação de caspase-1 ativada após infecção por BCG.....	40
Figura 20: Nod1, Nod2 e Rip2 não modulam formação de corpúsculos lipídicos induzida por BCG.....	42
Figura 21: Liberação de IL-1 β em macrófagos selvagens ou deficientes em Nod1, Nod2 e Rip2, infectados por BCG.....	43
Figura 22: Dosagem de PGE ₂ e LTB ₄ em sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea.....	44

Figura 23: ASC e caspase-1 influenciam a formação de corpúsculos lipídicos em diferentes tempos de infecção.....	45
Figura 24: ASC e caspase-1 são fundamentais para liberação de IL-1 β em macrófagos infectados por BCG.....	46
Figura 25: ASC e caspase-1 não modulam a produção de PGE ₂ e LTB ₄ em macrófagos infectados por BCG.....	47
Figura 26: O bloqueio de NLRP3 reduz a liberação de IL-1 β induzida por BCG.....	48
Figura 27: O bloqueio de NLRP3 potencializa a formação de corpúsculos lipídicos induzida por BCG.....	49
Figura 28: Efeito da inibição de NLRP3 na secreção de PGE ₂ e de LTB ₄	50
Figura 29: ATP induz biogênese de corpúsculos lipídicos.....	51
Figura 30: A ativação de inflamassomos por LPS e ATP leva ao aumento da liberação de eicosanóides.....	52
Figura 31: P2X ₇ é importante para a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por ATP.....	53
Figura 32: P2X ₇ participa da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BCG, e também da secreção de IL-1 β	54
Figura 33: A formação de corpúsculos lipídicos não depende da participação dos receptores de IL-1 e de IL-18.....	55
Figura 34: A liberação de IL-1 β é independente de IL-1R1 e IL-18R.....	56
Figura 35: A produção de PGE ₂ induzida por BCG é independente de IL-1R1 e IL-18R.....	56
Figura 36: Níveis de IL-1 β liberados em lavados peritoneais de animais infectados ou não com <i>M. bovis</i> BCG após 1, 6, 24 e 48 horas.....	58
Figura 37: Localização celular de NLRP3 após ativação com BCG.....	60
Figura 38: Localização celular de ASC após ativação com BCG.....	61
Figura 39: Localização celular de caspase-1 após ativação com BCG.....	62
Figura 40: Localização celular de IL-1 β após ativação com BCG.....	64
Figura 41: Localização celular de Nod1 após ativação com BCG.....	66
Figura 42: Localização celular de Nod2 após ativação com BCG.....	67
Figura 43: Localização celular de Rip2 após ativação com BCG.....	68
Figura 44: C75 diminui a formação de corpúsculos lipídicos e inibe a secreção de IL-1 β	70
Figura 45: Expressão de caspase-1 ativada em macrófagos infectados por	

BCG e com a enzima ácido graxo sintase inibida.....	71
Figura 46: C75 inibe expressão de IL-1 β induzida por BCG.....	72
Figura 47: Secreção de TNF α , KC e IL-10 em sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea.....	73
Figura 48: Secreção de PGE ₂ e LTB ₄ em sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea.....	74

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO.....	75
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

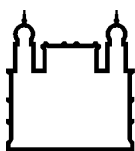
ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES DA RESPOSTA IMUNE INATA E DOS INFLAMASSOMOS NA BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DURANTE INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Carla Freitas

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas altamente associadas à resposta inflamatória. Eles estão presentes em diversos tipos celulares e podem aumentar em número e/ou tamanho frente a situações infecciosas. Também altamente envolvidos com os fenômenos inflamatórios estão os inflamassomos. Classicamente, esses complexos moleculares são formados por um tipo de receptor tipo Nod (NLR), uma proteína adaptadora (geralmente ASC) e a enzima caspase-1 ativada. A reunião destas proteínas e a ativação de caspase-1 levam à clivagem das pro-formas de IL-1 β e de IL-18 em suas formas maduras prontas para liberação. Apesar do avanço no conhecimento da biologia destas duas estruturas, corpúsculos lipídicos e inflamassomos, nada foi descrito sobre uma possível interação entre elas. Utilizando um modelo de estudo em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57Bl/6 e infecção com *Mycobacterium bovis* BCG buscamos pesquisar se existe essa interação e de que maneira isso ocorreria. Num primeiro momento, pesquisamos a influência de receptores tipo nod e proteínas relacionadas, na biogênese de CLs, na liberação de IL-1 β e de eicosanóides. Observamos que a infecção dos macrófagos com BCG é capaz de induzir liberação de IL-1 β e ativação de caspase-1, caracterizando ativação de inflamassomos. Vimos que a ausência de Nod1, Nod2, Rip2, IL-1R1 e IL-18R não interfere na biogênese de CL, nem na liberação de IL-1 β e de PGE₂ e LTB₄. A ausência de ASC, caspase-1 e o bloqueio de NLRP3 e P2X₇ potencializam a formação de corpúsculos lipídicos induzida por BCG. A ausência de ASC e caspase-1 não altera a liberação de eicosanóides e o bloqueio de NLRP3 reduz a liberação de IL-1 β e de PGE₂. Vimos que ATP é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dependente de P2X₇. Concluimos que a presença de proteínas envolvidas na via dos inflamassomos regula negativamente a biogênese de corpúsculo lipídicos. Corpúsculos lipídicos são conhecidos por compartimentalizar diversas proteínas envolvidas em importantes fenômenos celulares, dependendo do tipo celular e do estímulo. Sendo assim, no segundo bloco, avaliamos se os corpúsculos gerados pela infecção com BCG seriam capazes de armazenar NLRs e proteínas associadas. Também avaliamos se a inibição da formação de corpúsculos lipídicos teria impacto sobre a ativação de inflamassomos e liberação de mediadores inflamatórios. Observamos a presença de NLRP3, caspase-1, IL-1 β , Nod1, Nod2 e Rip2, mas não de ASC, nos corpúsculos lipídicos. Também vimos que a redução da formação de CL induzida por BCG leva à redução da liberação e da síntese de IL-1 β , mas não interfere na atividade de caspase-1. Diminuí também a liberação de citocinas pro e anti-inflamatórias, além de PGE₂. Baseado em nossos resultados, concluímos que existe sim uma relação entre CLs e inflamassomos, onde o segundo pode regular negativamente o primeiro e CLs podem servir de plataforma, pelo menos transitória, para a localização de proteínas da via dos NLRs. O avanço no entendimento das funções de inflamassomos e corpúsculos lipídicos pode colaborar para a geração de estratégias de combate às patologias associadas a estas duas estruturas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVOLVEMENT OF INNATE IMMUNE RESPONSE RECEPTORS AND INFLAMMASOMES IN LIPID BODIES BIOGENESIS AND FUNCTION DURING *Mycobacterium bovis* BCG INFECTION

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Carla Freitas

Pathogen-triggered dysregulation of host-cell lipid metabolism is emerging as a key feature in the pathogenesis of mycobacterial infection. Accumulating evidence suggests that modulation of host lipid metabolism through mycobacteria-induced lipid body (LB) formation is an important mechanism for mycobacterial survival and growth. However the mechanisms involved in lipid body biogenesis are still not completely understood. Mycobacterial-induced inflammasome activation of caspase-1 and consequent secretion of IL-1 β and IL-18 in macrophages has been demonstrated as a host-defense mechanism. In the present study we investigated the participation of inflammasomes in lipid body biogenesis and function during infection with *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. We observed IL-1 β release and caspase-1 activation in bone marrow macrophage, featuring inflammasome activation induced by BCG. Nod1, Nod2, Rip2, IL-1R1 and IL-18R doesn't influence lipid bodies biogenesis, neither IL-1 β nor PGE₂ and LTB₄ release induced by BCG. ASC and caspase-1 absence and the block of NLRP3 and P2X₇ leads to increase lipid bodies number induced by BCG. The absence of caspase-1 and ASC inhibited the release of IL-1 β induced by BCG, but does not alter the release of eicosanoids. Blocking NLRP3 reduces the release of both, IL-1 β and PGE₂. Using an activator of inflammasomes, ATP, we observed an induced lipid body biogenesis in a P2X₇-dependent manner. Activation of inflammasomes by LPS and ATP leads to increased release of eicosanoids, besides the formation of LBs. We conclude that the presence of proteins involved in the pathway of inflammasomes negatively regulates biogenesis of lipid bodies. Lipid bodies are known to compartmentalize many different proteins associated with cell signaling, depending on the cell type and stimulus. Thus, in the second block, we assessed whether the LBs generated by infection with BCG would be able to contain NLRs and associated proteins. We also evaluated whether the inhibition of lipid body formation would impact inflammasomes activation and release of inflammatory mediators. We observed NLRP3, caspase-1, IL-1 β , Nod1, Nod2 and RIP2, but not ASC are associated with lipid bodies. Also, we have that the reduction in the formation of LC induced by BCG leads to reduced synthesis and release of IL-1 β but did not interfere in the activity of caspase-1. It also reduces the release of cytokines, in addition to PGE₂. Based on our results, we conclude that inflammasomes activation could negatively regulate the lipid bodies biogenesis. Moreover, lipid bodies could be site of localization to NLRs and associated-protein, but they doesn't interfere in inflammasomes activation, although the IL-1 β release is reduced by lipid bodies numbers decreased. The knowledge of inflammasome and lipid bodies biology could be useful to generate new approaches to diseases associated with these structures.

INTRODUÇÃO

1. Reconhecimento pelo Sistema Imune Inato

O sistema imunológico é um conjunto de estruturas e processos biológicos que protegem o organismo contra doenças, especialmente as causadas por patógenos e suas toxinas, mas também doenças auto-imunes e doenças desencadeadas por substâncias não infecciosas que podem causar danos aos órgãos e tecidos. É dividido, didaticamente, em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. O sistema imune inato consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a elas. O sistema imune adaptativo se desenvolve posteriormente às defesas inatas e consiste na ativação de linfócitos B, para produção de anticorpos (imunidade humoral) e de linfócitos T (imunidade celular), para destruição dos microorganismos presentes em células fagocitárias ou a destruição da célula infectada para eliminar o reservatório da infecção.

As defesas inatas são constituídas de barreiras físicas, células e moléculas secretadas. As barreiras físicas são formadas por pele e mucosas e estas contêm barreiras químicas, como peptídeos anti-microbianos, ácidos graxos, pH, enzimas. Além disso, a própria microbiota normal destas regiões do indivíduo contribui para a proteção, seja por competição com possíveis agentes patogênicos ou por produção de substâncias que ajudam a proteger o organismo.

As células envolvidas na defesa imune inata podem estar presentes em órgãos e em tecidos, como o sangue, de onde podem migrar para o foco da condição a ser combatida. São principalmente fagócitos, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Essas células fagocitam (sendo a fagocitose um importante mecanismo efetor da imunidade inata) os patógenos, tentando eliminá-los do organismo e matando-os através da produção de enzimas e radicais oxidantes. O processo de fagocitose pode ser mediado, dentre outros fatores, por proteínas do sistema complemento, que são proteínas circulantes no sangue, ativadas pela presença de microorganismo, que contribuem para a inflamação e realizam opsonização de microorganismos para a fagocitose e morte dos patógenos. Os fagócitos também podem secretar substâncias, como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, que ajudam a combater os patógenos por promover ativação de outros tipos celulares.

Existe uma condição fundamental para o início da resposta imune, o reconhecimento: a presença de um agente potencialmente nocivo deve ser detectada. O reconhecimento é feito por algumas famílias de receptores presentes em virtualmente todas os tipos celulares.

Esses receptores são chamados em conjunto de PRRs, receptores de reconhecimento de padrões. Compreendem um grupo de sensores presentes na membrana plasmática ou no interior da célula hospedeira, no citoplasma ou em vesículas como endossomos. Existem diversas famílias de receptores dentro da super família PRR, tais como receptores de lectina tipo C, receptores tipo RIG, receptores tipo toll e receptores tipo Nod (figura 1).

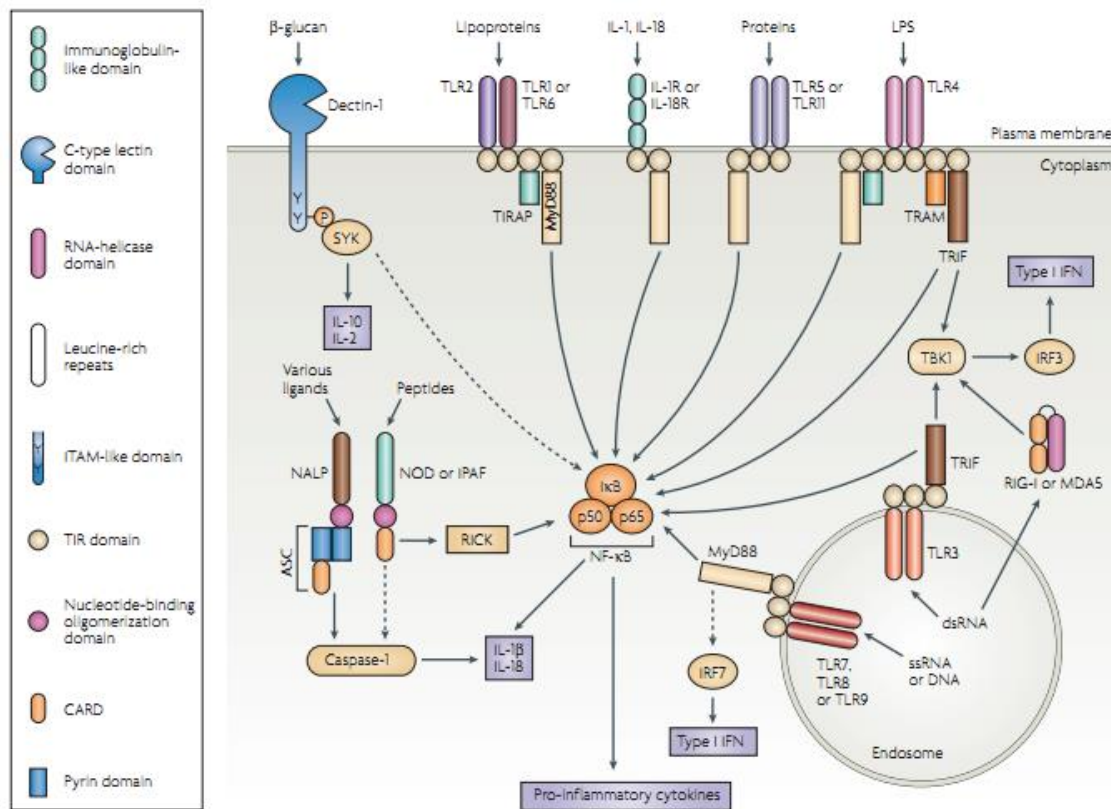


Figura 1: Representação esquemática da estrutura e das principais vias ativadas pelos PRRs. PRRs podem estar presentes na membrana plasmática, no citoplasma e em endossomas. Os mais bem caracterizados são as famílias TLRs, receptores de lectina, receptores tipo RIG e receptores tipo Nod. Estes receptores são ativados por diversos componentes microbianos ou moléculas que sinalizam dano celular e desencadeiam cascatas de sinalização intracelular envolvendo diversas proteínas. (Trinchieri & Sher, 2007).

Os PRRs reconhecem moléculas presentes em patógenos (PAMPs - *pathogen-associated molecular pattern*) que não estão presentes nas células do hospedeiro, como estruturas de parede celular e material genético. Estas são partes dos patógenos que

foram conservadas evolutivamente devido à sua importância para a vida do microorganismo. Além disso, esses receptores também são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a perigo (DAMPs - *danger-associated molecular pattern*) liberados por células em situações desfavoráveis.

A existência de múltiplos sistemas de detecção de patógenos, com a existência de diferentes famílias de PRRs, garante uma ampla cobertura do mundo microbiano, enquanto a diversidade e a redundância de alguns mecanismos efetores contribui para a intensidade das defesas do hospedeiro diante da evolução contínua dos patógenos (Nish and Medzhitov, 2011).

PRRs são responsáveis por discriminar entre componentes de microorganismos patogênicos ou comensais (não-patogênicos). Essa tarefa, fundamental para a geração de resposta imune apropriada, leva em consideração não somente o tipo de PAMP, mas também onde ele está presente (no ambiente extra ou intracelular) e o contexto em que esse PAMP é reconhecido, se existe reconhecimento também de moléculas derivadas do hospedeiro (Vance *et al.*, 2009).

Como citado anteriormente, existem algumas famílias de PRRs, tais como receptores de lectina tipo C, receptores tipo RIG, TLRs e NLRs. Na superfície das células fagocíticas, receptores de lectina tipo C, tais como receptores de manose e receptores de β -glucanos, por exemplo, dectina-1, participam na ligação e englobamento de componentes microbianos (Trinchieri & Sher, 2007).

Os receptores do tipo RIG-I localizam-se no citoplasma das células e são responsáveis pelo reconhecimento de RNA viral de dupla fita, ativando vias de sinalização intracelulares que favorecem o combate à replicação viral (Creagh & O'Neill, 2006).

A família de receptores melhor caracterizada dos PRRs é a família *toll-like receptors*, TLRs. Dez membros da família TLR foram identificados em humanos e 12 em camundongos (O'Neill, 2006). Estes receptores são glicoproteínas de membrana que consistem de três domínios: um domínio extracelular, com sequências ricas em leucina (LRRs, *leucine rich repeats*), que permite a interação com os PAMPs; um domínio transmembranar; e um domínio citoplasmático, conhecido como domínio Toll/receptor de interleucina-1 (TIR, *Toll/interleukin-1 receptor*), que apresenta homologia com o receptor de interleucina-1 e é necessário para a transdução de sinais.

Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na superfície celular e reconhecem, principalmente, os PAMPs derivados de bactérias, fungos e protozoários. Já os TLRs 3,

7, 8 e 9 são expressos em compartimentos endocíticos e reconhecem, especialmente, ácidos nucleicos derivados de vírus e bactérias (figura 2).

Pathogen	Toll-like receptor (TLR)	TLR ligand
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	TLR2	Lipoarabinomannan
	TLR4	Phosphatidylinositol mannosides
	TLR9	DNA
<i>Salmonella typhimurium</i>	TLR2	Bacterial lipoprotein
	TLR4	Lipopolysaccharide
	TLR5	Flagellin
<i>Neisseria meningitidis</i>	TLR2	Porin
	TLR4	Lipopolysaccharide
	TLR9	DNA
<i>Haemophilus influenzae</i>	TLR2	Lipoprotein
	TLR4	Lipopolysaccharide
<i>Candida albicans</i>	TLR2	Phospholipomannan
	TLR4	Mannan
	TLR9	DNA
Murine cytomegalovirus	TLR2	Viral protein
	TLR3	Double-stranded RNA
	TLR9	DNA
Herpes simplex virus	TLR2	Viral protein
	TLR3	Double-stranded RNA
	TLR9	DNA
Influenza virus	TLR7, TLR8	Single-stranded RNA
	TLR3	Double-stranded RNA
	TLR4	Not determined
Respiratory syncytial virus	TLR3	Double-stranded RNA
	TLR4	Envelope F protein
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TLR2	Glycosylphosphatidylinositol anchor
	TLR4	Glycolipid-ceramide
	TLR9	DNA
<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR2	Glycosylphosphatidylinositol anchor?
	TLR11	Profilin

Figura 2: Exemplos de patógenos expressando ligantes para múltiplos TLRs (Trinchieri & Sher, 2007).

Quando TLRs reconhecem seus ligantes, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, que se associam através de seu domínio TIR ao TIR do TLR. Todos os TLRs, exceto TLR3, recrutam a proteína adaptadora MyD88 como passo inicial da cascata de sinalização. MyD88 pode se associar com outra proteína adaptadora, IRAK. Esta, por sua vez, interage com TRAF6, que ativa TAK1, que se associa a proteínas TAB. Uma dessas, TAB1, ativa o complexo IKK, que fosforila I κ B e permite o deslocamento de NF- κ B, que estava inativo no citoplasma, para o núcleo da célula, onde promove a transcrição de genes associados à resposta inflamatória, como TNF, IL-6, IL-12, IL-1 β , IFN. TAK1 também ativa membros da família de MAP quinases como JNK, p38 e ERK, que levam à ativação de outro fator transcricional, AP-1 (Becker & O'Neill,

2007). TLR3 e TLR4 podem recrutar um adaptador diferente, TRIF, que leva à dimerização e ativação do inibidor de kinase NF- κ B (IKKi) e da quinase de ligação do ativador de NF- κ B associado ao membro da família TRAF (TBK1). A ativação de TBK1/IKKi leva à fosforilação do fator de transcrição IRF3, induzindo sua translocação para o núcleo e subsequente transcrição de genes relacionados ao interferon (Arpaia & Barton, 2013).

Estudos cristalográficos dos TLRs juntos com seus ligantes demonstraram que estes receptores são capazes de formar heterodímeros uns com os outros, por exemplo, TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6, que são capazes de reconhecer lipopeptídios e lipoproteínas de bactérias gram positivas. Além disso, também foi observada a interação com moléculas acessórias, como TLR4/MD2 (*myeloid differentiation factor-2*) e TLR4/CD14; ou ainda a formação de homodímeros, tais como TLR3/TLR3 (Becker & O'Neill, 2007).

1.1: Receptores tipo Nod

Nod-like receptors (NLRs) são uma família de proteínas intracelulares que desempenham um papel fundamental na regulação da resposta imune inata do hospedeiro. Existem 22 membros da família NLR em humanos e mais de 30 genes NLR em camundongos (Moreira e Zamboni, 2012). NLRs são expressos em muitos tipos celulares, embora certos membros sejam expressos primariamente em fagócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos. Homólogos dos NLRs estão presentes em vertebrados e organismos filogeneticamente primitivos, tais como ouriço, que tem no seu genoma pelo menos 203 supostos NLRs (Hibino *et al.*, 2006). NLRs foram também identificados em plantas (genes R) onde eles desempenham um papel crítico na resistência a doenças contra parasitos e bactérias (Belkhadir *et al.*, 2004; DeYoung *et al.*, 2006). A conservação evolucionária dos NLRs sugere que eles desempenham uma importante função na defesa do hospedeiro. NLRs podem atuar como uma segunda linha de defesa para detectar patógenos capazes de escapar dos sistemas de detecção das superfícies celulares (Eisenbarth & Flavell, 2009).

NLRs são proteínas multi-domínio, tri-partidas, compostas de: um domínio efetor N-terminal variável, que pode ser um domínio de recrutamento de caspase (CARD), domínio pirina (PYD), domínio ácido ou repetições de inibidor de baculovírus (BIRs); um domínio de nucleotídeo chamado de domínio NACHT (também chamado de domínio NOD), o qual é responsável pela capacidade de oligomerização entre NLRs e

consequente ativação destes; e um domínio C-terminal de repetições ricas em leucina (LRRs) envolvido no reconhecimento de PAMPs ou DAMPs (Martinon *et al.*, 2009; Franchi *et al.*, 2009; figura 3).

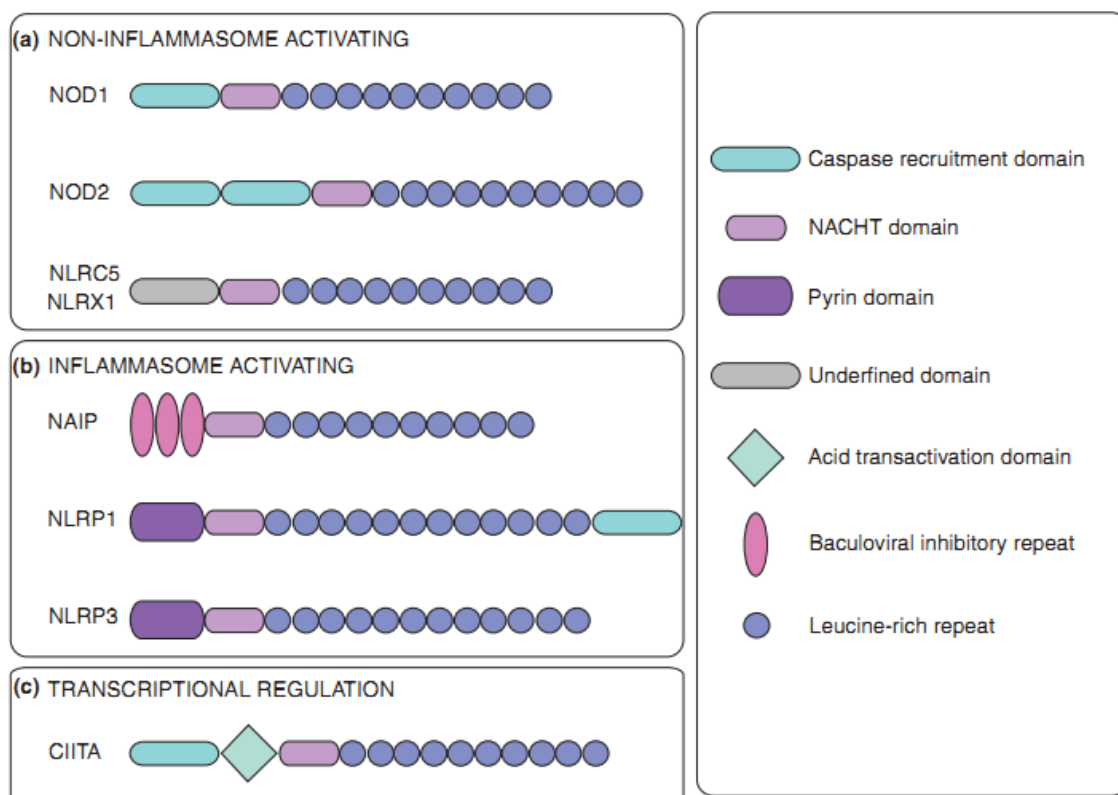


Figura 3: Estrutura dos NLRs. NLRs são receptores compostos por diferentes domínios e cada um dos domínios possui uma função que contribui para a execução do papel biológico do receptor (Magalhães *et al.*, 2011).

A nomenclatura dos NLR é baseada em sua estrutura. Por exemplo, NLRP é o NLR que contém o domínio PYD na porção N-terminal e NLRC é o NLR que contém CARD (Denes *et al.*, 2012).

Os domínios N-terminais de NLRs medeiam sinalização através de sua interação homofílica com proteínas abaixo da cascata. Domínios CARD e PYD pertencem à superfamília de domínios de morte, que estão envolvidos em muitos processos celulares incluindo apoptose e inflamação. O domínio CARD permite a ligação e ativação de caspase-1 ou da serina-treonina quinase RIP2, também conhecido como proteína adaptadora RICK. O domínio PYD é responsável pela interação com proteínas adaptadoras que recrutam caspase-1 (Franchi *et al.*, 2009).

Acredita-se que os NLRs permaneçam em seu estado inativo até a detecção do ligante pelo seu domínio LRR, o que resulta em mudanças conformacionais que permitem a oligomerização via domínio NOD e abrem a proteína para que o domínio N-

terminal seja exposto e ocorra a sinalização. Existem alguns NLRs que são melhor caracterizados e estes podem ser ativados por diversos agonistas, tanto por patógenos e seus componentes quanto por moléculas endógenas (DAMPs). A ativação da maioria dos NLRs leva à ativação de caspase-1 de maneira dependente ou independente da proteína adaptadora ASC (figura 4).

Os diversos membros da família NLR podem ser classificados em 3 sub-grupos principais. O primeiro grupo é constituído de receptores que, após cascata de sinalização, levam à ativação de fatores transcripcionais, como NF- κ B; Nod1 e Nod2 se enquadram nesta categoria. O segundo é composto por receptores que não dependem da proteína adaptadora ASC para desencadear a ativação de caspase-1, por exemplo, NLRC4 e NAIP5. E o terceiro tem como principal representante NLRP3, e se caracteriza pela necessidade de ASC para ativar caspase-1 (Massis e Zamboni, 2013).

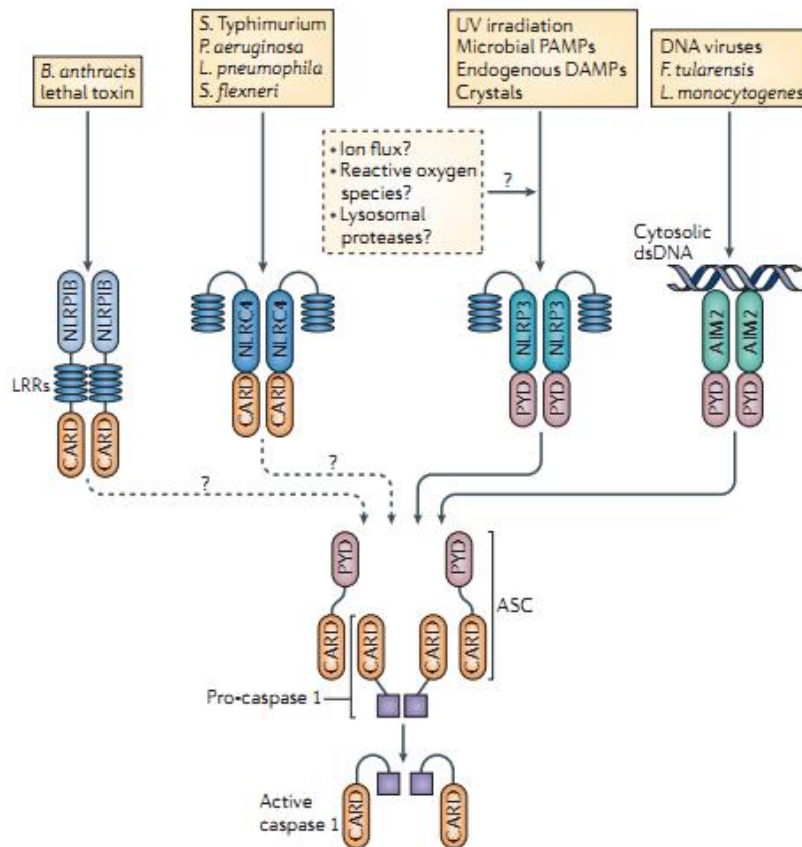


Figura 4: Ativação de NLRs por bactérias, PAMPs e DAMPs. Os NLRs melhor caracterizados são ilustrados nesta figura. Também seus ativadores são mostrados. Estes podem ser bactérias, vírus ou DAMPs. A ativação desses receptores leva à ativação de caspase-1, com ou sem participação da proteína adaptadora ASC (Lamkanfi, 2011).

1.1.1: Nod1 e Nod2

Nod1 e Nod2 são proteínas multi-domínio consistindo de um ou dois domínios CARD, respectivamente, um domínio NOD localizado centralmente seguido por determinado número de LRR C-terminais (figura 3). Nod1 é expresso amplamente em muitos tipos celulares e órgãos. Já Nod2 é expresso em células como macrófagos, células dendríticas, células de Paneth, queratinócitos e células epiteliais do intestino, pulmão e cavidade oral (Takahashi *et al.*, 2006).

A expressão destes receptores pode ser modulada em função de estímulos, patogênicos ou não. Por exemplo, a sinalização desencadeada por TLR4 e TNF α em macrófagos murinos tratados com LPS leva ao aumento da expressão de mRNA de Nod1 e Nod2 (Takahashi *et al.*, 2006).

Nod1 e Nod2 reconhecem moléculas bacterianas produzidas durante a síntese, degradação e remodelamento de peptidoglicano (PGN), o maior componente da parede celular bacteriana (Franchi *et al.*, 2009). Peptidoglicano é um polímero composto de unidades de cadeias glicanos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) alternadas com as de ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) ligadas de forma cruzada e unidas umas às outras por pequenos peptídios. Nod2 reconhece muramil dipeptídio (MDP), que é encontrado no peptidoglicano de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e em micobactérias, que não se enquadram na classificação baseada na coloração de Gram. Nod1 reconhece fragmentos de PGN contendo ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP). DAP é um resíduo de aminoácido do peptidoglicano da maior parte das bactérias Gram-negativas e de certas bactérias Gram-positivas (Park *et al.*, 2007). A análise de compostos sintéticos revelaram o dipeptídio γ -D-glutamil-*meso*-DAP (iE-DAP) como o motivo mínimo que é suficiente para desencadear a ativação de Nod1 (Girardin *et al.*, 2003).

Após o reconhecimento microbiano, Nod1 e Nod2 sofrem mudanças conformacionais, que resultam na auto oligomerização via domínio NOD. Essa oligomerização favorece o recrutamento direto da serina-treonina quinase RIP2 através de interações CARD-CARD, pelo mecanismo de proximidade induzida. RIP2 recruta TRAF6, que ativa TAK1 e esta ubiquitina IKK, que fosforila o inibidor I κ B, levando à sua degradação via proteassoma, liberando NF- κ B e permitindo sua translocação para o núcleo (figura 5). Ativação de Nod1 e Nod2 também pode ativar MAP quinases, como p38, ERK, JNK (Moreira & Zamboni, 2012).

A estimulação de Nod1 e Nod2 resulta na secreção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas IL-8 (ou KC, em camundongos), IL-6, MIP2 (proteína-2 inflamatória de macrófago), MCP-1, RANTES, e na geração de óxido nítrico (NO). A

ativação de Nod1 induz recrutamento de neutrófilos *in vivo* e a sinalização via ambos Nods leva à produção de peptídeos anti-microbianos (revisado por Franchi *et al.*, 2009).

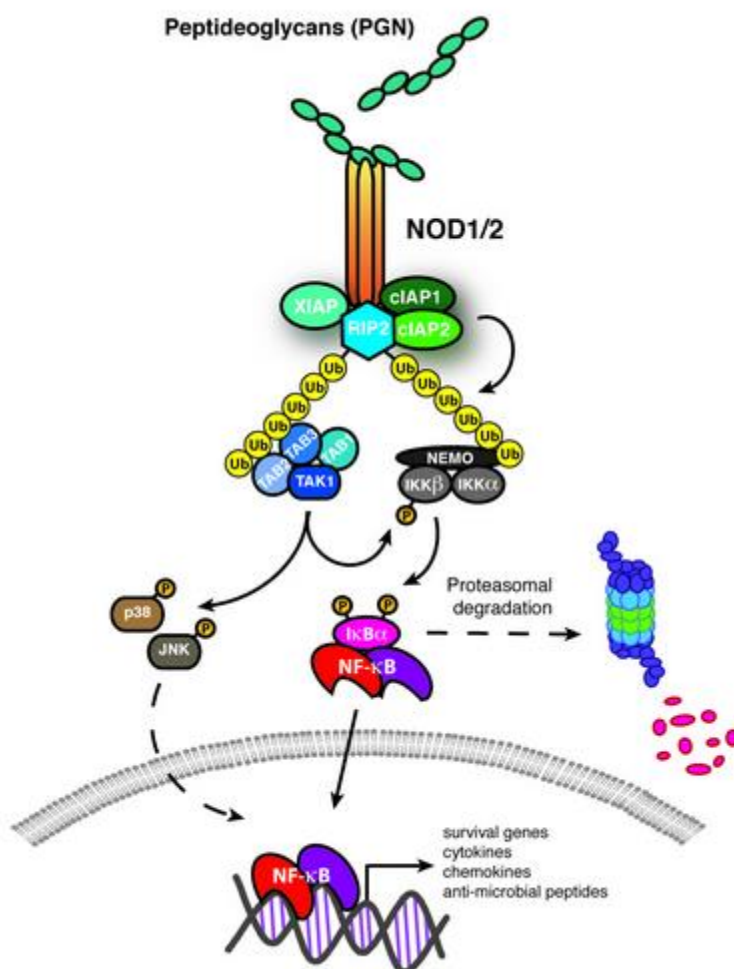


Figura 5: Vias de sinalização desencadeadas por Nod1 e Nod2. Esses receptores são ativados por componentes do peptidoglicano e desencadeiam uma cascata de sinalização que culmina com migração de NF-κB para o núcleo, onde este ativa a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória (Damgaard and Gyrð-Hansen, 2011).

Os mecanismos pelos quais fragmentos de PGN entram na célula hospedeira para induzir ativação de Nod1 e Nod2 são ainda pouco entendidos. Existem evidências que agonistas de Nod1 podem entrar no citosol de células epiteliais através de poros formados por toxinas produzidas pelas bactérias (Ratner *et al.*, 2007). Ainda, os ligantes produzidos pela bactéria podem entrar na célula via endocitose ou transportadores epiteliais (Marina-Garcia *et al.*, 2008).

Dados da literatura sugerem que Nod1 e Nod2 tem um papel sinérgico com TLRs no reconhecimento de bactérias e contribuem para a produção de moléculas anti-microbianas e pro-inflamatórias (Park *et al.*, 2007). TLR2, TLR4 e Nod2 desencadeiam

vias não redundantes de reconhecimento de *Mycobacterium tuberculosis*, que sinergizam para a indução de resposta inflamatória (Ferwerda *et al.*, 2005). Nod1 e Nod2 cooperam com os TLRs aumentando a sensibilidade para detecção de patógenos. Mas é possível que essa sinergia ocorra dependendo do estímulo e do tipo celular envolvido (Becker and O'Neil, 2007).

Também tem sido proposta uma cooperação entre Nod2 e NLRP1/NLRP3 na ativação de caspase-1 e geração de IL-1 β madura. Esses três receptores parecem ser estimulados por MDP, mas geram diferentes respostas. O reconhecimento de MDP por Nod2 leva à ativação de NF- κ B e isso aumenta a transcrição de pro-IL-1 β . Já o reconhecimento de MDP por NLRP1/NLRP3 leva à ativação de caspase-1 e processamento de pro-IL-1 β em sua forma ativa. Contudo, os receptores Nod1 e Nod2 possuem domínio CARD e, portanto, poderiam interagir com caspase-1. Assim, o reconhecimento de MDP por Nod2 poderia ativar caspase-1, sem necessidade de interações com NLRP1/NLRP3 (Ferwerda *et al.*, 2008). Ainda nesse sentido, Yoo *et al* (2002) mostraram que Nod1 interage com caspase-1, através dos domínios CARD, aumentando a secreção de IL-1 β .

Em células dendríticas primárias humanas, ligantes dos Nods induziram, em sinergia com ligantes de TLRs, expressão aumentada de muitas moléculas co-estimulatórias, tais como CD80, CD86 e CD40. Similarmente, ligantes de Nod e TLR cooperam em células dendríticas para desencadear liberação de IL-12, uma citocina essencial para a resposta Th1 (revisado por Bourhis *et al.*, 2007).

Trabalhos mostram a participação de Nod1 e Nod2 na indução de autofagia. Este é um mecanismo de degradação altamente conservado, no qual componentes específicos da célula, incluindo organelas danificadas ou proteínas, são engolfadas em uma estrutura com uma dupla membrana para degradação (revisado por Bortoluci e Medzhitov, 2010). Travassos *et al* (2010) mostraram que, em modelos de infecção, Nod1 e Nod2 recrutam ATG16L1, uma proteína que inicia a autofagia, para a membrana plasmática no local de entrada da bactéria. Com isso forma-se o autofagossomo, que leva à degradação da bactéria. Os autores mostram também que este processo é independente de Rip2 e de NF- κ B. Outro grupo mostrou que o reconhecimento de MDP por Nod2 induz autofagia em células dendríticas e esse processo é dependente de Rip2. Além disso, este trabalho também associa a ativação de Nod2 com o processamento e apresentação de antígenos pelas células dendríticas (Cooney *et al.*, 2010).

1.1.2: Inflamassomos

Inflamassomos são complexos de alto peso molecular, envolvidos na ativação de caspases inflamatórias resultando no processamento de pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas maduras que são liberadas para o meio extracelular ou ainda levando a um tipo de morte celular chamado de piroptose (Martinon *et al.*, 2009).

Inflamassomo é a reunião da palavra inflamação – que reflete a função deste complexo – e o sufixo “somo” do grego significa corpo (Martinon *et al.*, 2009). O termo inflamassomo foi cunhado em 2002 para descrever complexos multi-protéicos (figura 6) formados no citosol após estimulação por PAMPs ou DAMPs. São compostos por um NLR, uma proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e a forma ativa de caspase-1. Através da ação proteolítica de caspase-1, essa plataforma molecular cliva citocinas sem peptídios sinais tradicionais resultando em sua secreção. Os inflamossomos tem a habilidade de transformar pro- IL-1 β , pro-IL-18 e, em alguns casos, pro-IL-33 em suas formas ativas resultando em sua secreção e potente resposta inflamatória associada com essas citocinas (Martinon *et al.*, 2002).

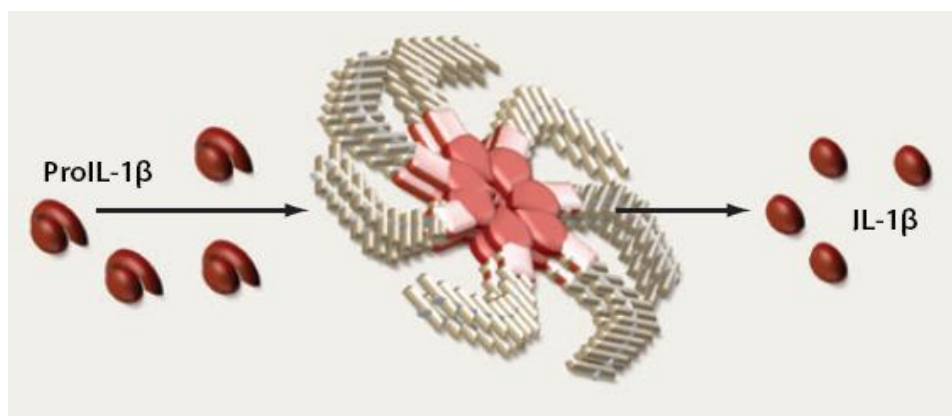


Figura 6: Esquema de estrutura básica de um inflamassomo. Inflamassomos clássicos são compostos de um NLR, uma proteína adaptadora e caspase-1, que é capaz de clivar a pro-forma de IL-1 β em sua forma madura (Martinon *et al.*, 2009).

A ativação de inflamassomos acontece em células que expressam todos os componentes em altas concentrações e em formas ativas. A maior parte das células não expressam todos os componentes requeridos para ativação dos inflamossomas, necessitando estimulação anterior ou sensibilização (Martinon *et al.*, 2009).

Antes da sinalização via agonista de NLR, muitos estudos *in vitro* tem mostrado a necessidade de um “sinal inicial”, para induzir a formação de pro-citocinas e permitir

atividade dos inflamassomos. Na maioria dos casos, o primeiro sinal é providenciado por um agonista de TLR, tal como LPS. Essa cooperação entre PRR pode ser importante para prevenir uma ativação inapropriada de NLRs por moléculas próprias presentes ubiquitivamente. Não está claro se a mesma regra se aplica *in vivo* (Eisenbarth & Flavell, 2009). Em alguns casos, o primeiro sinal para a geração das pro-citocinas, também pode ser originado com ativação de Nod1 e/ou Nod2, que leva à ativação de NF- κ B e indução de genes e proteínas pro- inflamatórios, como pro-IL-1 e pro-IL-18 (Elinav *et al.*, 2011). Então, a ativação do NLR ("sinal 2") permite a clivagem destas pro-formas de citocinas em suas formas para secreção.

Após a ativação e oligomerização de um NLR, ocorre acoplamento, via interações entre domínios CARD, de enzimas anteriormente denominadas ICE (*Interleukin-1 β -converting enzyme*) e atualmente chamadas de caspases. Os NLRs que não possuem o domínio CARD precisam do auxílio da molécula adaptadora ASC, que contém um domínio CARD e um PYD, e faz a ligação entre o NLR e caspase-1.

Inflamassomos estão fortemente associados à detecção intracelular de patógenos ou produtos microbianos que ganham acesso ao interior celular ou ainda de moléculas do hospedeiro liberadas durante estado de estresse ou dano celular (figura 7).

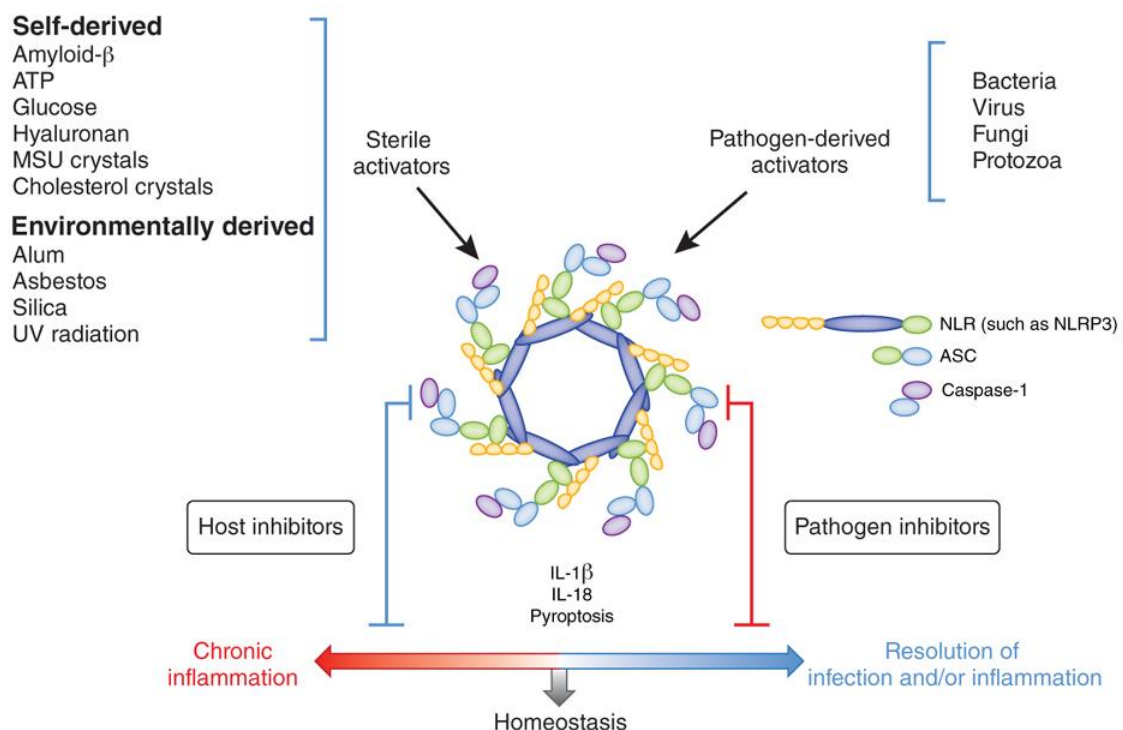


Figura 7: Moléculas de patógenos (PAMPs) ou do hospedeiro ou do ambiente (DAMPs) na ativação de inflamassomos. A formação dos inflamassomos é regulada por moléculas derivadas tanto do hospedeiro quanto dos patógenos e o balanço entre essas respostas pode levar à inflamação crônica ou à resolução da inflamação (Henao-Mejia *et al.*, 2012).

O reconhecimento de DAMPs permite a percepção de um dano tecidual e isso desencadearia processos inflamatórios e de reparo tecidual, com recrutamento de células, liberação de mediadores solúveis, modulação da expressão de moléculas etc. Parece então que o sistema imune inato não somente verifica o ambiente celular para sinais de microorganismos potencialmente patogênicos, mas também reconhece moléculas próprias geradas em condições chamadas de inflamação estéril (Martinon *et al.*, 2009).

TLR4 reconhece a molécula de heme, um DAMP, liberada em condições de hemólise ou dano celular extremo, e isso induz a liberação de TNF α e KC (Figueiredo *et al.*, 2007). Ainda, o reconhecimento de LDL oxidado, outra molécula endógena, pelo receptor scavenger CD36 leva à geração de espécies reativas de oxigênio, que então, ativam NLRP3 e levam à síntese, processamento e liberação de IL-1 β (Liu *et al.*, 2013). Nota-se, com isso, que receptores comprometidos com a resposta imune inata, além de reconhecer PAMPs, medeiam respostas associadas ao reconhecimento de moléculas endógenas. O reconhecimento de DAMPs desencadeia a formação de inflamassomas da mesma forma que PAMPs o fazem, com ativação de caspase-1 e processamento e liberação de IL-1 β .

Caspases são proteases produzidas como zimogênios inativos cataliticamente e usualmente sofrem processamento proteolítico durante ativação. Após estimulação por uma variedade de sinais endógenos e microbianos, a molécula pro-caspase inativa é auto-ativada por clivagem proteolítica em um heterodímero enzimaticamente ativo composto de uma cadeia de 10kDa e uma de 20kDa (Franchi *et al.*, 2008).

Caspases humanas podem ser divididas em dois diferentes grupos baseado em sua função biológica: caspases inflamatórias, caspase-1, caspase-4, caspase-5, caspase-11 e caspase-12; e caspases apoptóticas, que incluem caspase-2, caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 e caspase-10. O primeiro grupo é denominado inflamatório porque os principais substratos estudados até então são citocinas (tais como IL-1 β , IL-18 e em alguns casos, IL-33) que são mediadores cruciais da resposta inflamatória. Apesar desta classificação, diversos trabalhos mostram a interação entre os dois grupos de caspases e isto mostra que elas podem não ser exclusivamente apoptóticas ou exclusivamente inflamatórias (revisado por Denes *et al.*, 2012).

Caspase-1 foi a primeira caspase a ser descoberta em mamíferos, com o nome de ICEberg, mas somente há pouco tempo as vias que levam a sua ativação foram descobertas. Recentemente, um trabalho listou os 121 substratos de caspase-1 conhecidos até o presente momento baseado em análises proteômicas. Alguns estão

ilustrados na figura 9. A análise desses novos substratos nos permite associar caspase-1 a alguns eventos biológicos (além da inflamação), tais como: morte celular, reparo tecidual, metabolismo e organização de citoesqueleto (Denes *et al.*, 2012; figuras 8 e 9).

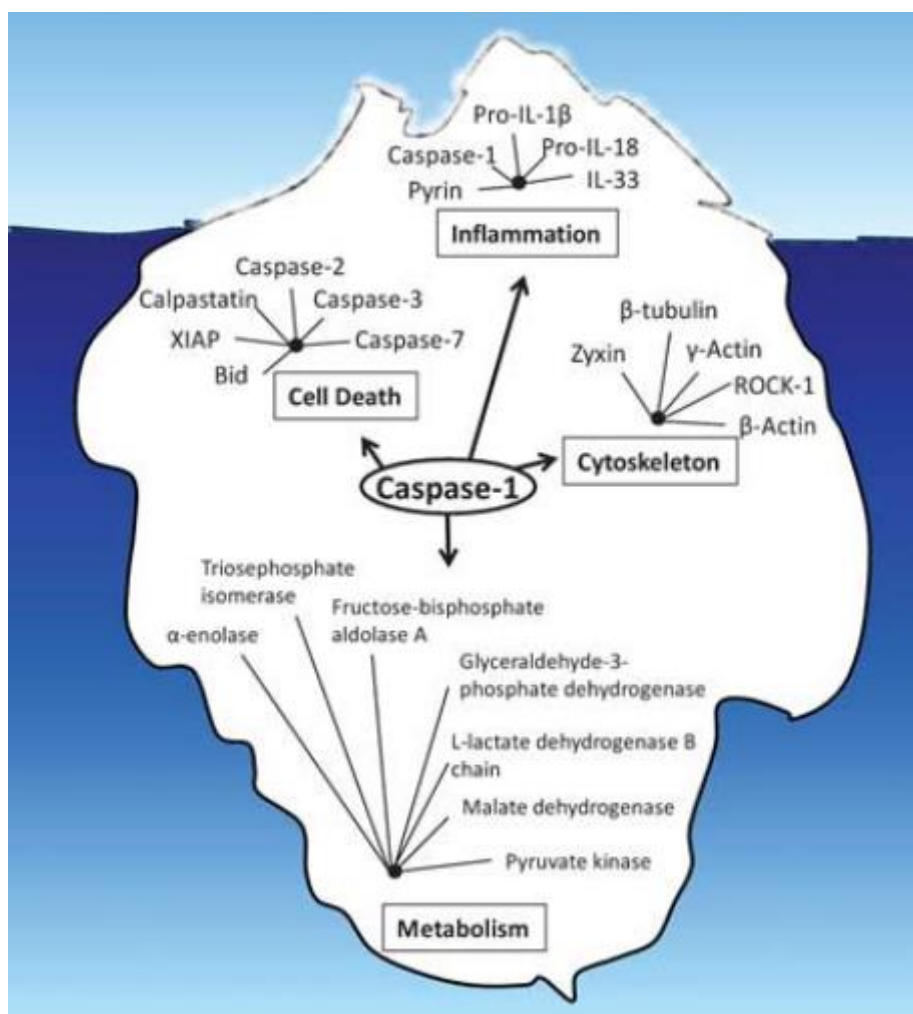


Figura 8: IL-1 β é somente a ponta do ICEberg? Observam-se alguns novos substratos descritos para caspase-1 e baseado neles pode-se associar a participação da enzima em processos celulares como morte e metabolismo celular, dentre outros (Denes *et al.*, 2012).

Com a descoberta de novos substratos para caspase-1 surgem então possíveis novas funções efetoras para os inflamassomos na imunidade e defesa do hospedeiro. Caspase-1, além de ser responsável pela liberação de IL-1 β e IL-18, também participa na liberação de outras citocinas sem peptídeo sinal e de DAMPs, como HMGB1. A ativação excessiva de caspase-1 leva à morte por piroptose. Também é capaz de regular vias glicolíticas e lipídicas em células infectadas. Ainda, pode restringir a replicação de patógenos intracelulares por ativar outras caspases, como caspase-7. Esses novos mecanismos efetores sugeridos a partir dos substratos de caspase-1 são resumidos na figura 9. É importante notar que esses mecanismos efetores atuam de maneira

independente dos substratos canônicos de caspase-1, IL-1 β e IL-18, indicando que inflamassomos podem contribuir para a resposta imune por diferentes vias. Isso favorece a montagem de uma resposta apropriada e eficiente no combate à patógenos.

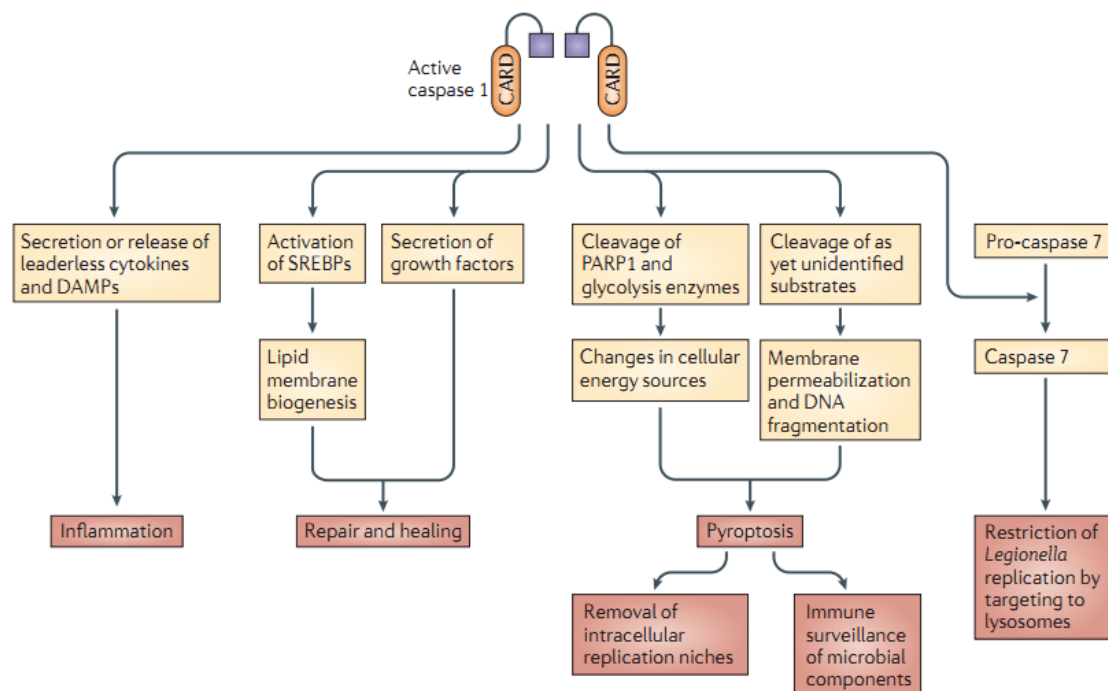


Figura 9: Mecanismos efetores de caspase-1. A ativação de caspase-1 leva à ativação de vias que culminam em fenômenos como inflamação, reparo tecidual, piroptose e restrição da replicação de patógenos intracelulares (Lamkanfi, 2011).

Recentemente, Kayagaki *et al* (2011) mostraram que os genes de caspase-1 e caspase -11 são muito próximos no genoma para serem segregados por recombinação, e consequentemente, todos os camundongos deficientes em caspase-1 seriam também deficientes em caspase-11. Este mesmo trabalho mostra que caspase-11 desencadeia piroptose de macrófagos independentemente de caspase-1. Apesar dos recentes estudos, pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação de caspase-11 e sua função na morte celular e em processos inflamatórios.

Paralelamente à esta descoberta, vem sendo descrita a formação de inflamassomos, chamados de não-canônicos, com participação de caspase-11. Um recente trabalho mostrou a ativação de caspase-11 e secreção de IL-1 β em macrófagos, por LPS intracelular de maneira independente do reconhecimento deste PAMP por TLR4. Mas mantém-se a necessidade de priming (assim como acontece com a ativação de inflamassomos canônicos) por outros agonistas de TLRs para o aumento da expressão de pro-caspase-11 e pro-IL-1 β (Kayagaki *et al.*, 2013).

Sob certas condições, a ativação de inflamassomos e, portanto, de caspases inflamatórias, levam a morte celular. A piroptose é um tipo de morte rápida, dependente da ativação de caspase-1, caracterizada pela ruptura da membrana plasmática após formação de poros e liberação do conteúdo inflamatório (Bergsbaken *et al.*, 2009). Essas características contrastam com a morte silenciosa apoptótica, onde o conteúdo celular é empacotado em vesículas que são removidas através de fagocitose. A piroptose ocorre frequentemente após infecção com patógenos intracelulares (Martinon *et al.*, 2009). A morte celular por piroptose de células infectadas expõe as bactérias intracelulares aos mecanismos imunes extracelulares, como a destruição por neutrófilos (Lamkanfi *et al.*, 2011).

Inflamassomo NLRP3

Estudos revelaram que NLRP3 forma um inflamassomo com ASC e caspase-1 em células humanas e murinas. NLRP3 é ativado por múltiplos PAMPs incluindo LPS, MDP, RNA viral e bacteriano e algumas outras moléculas. NLRP3 também tem sido implicado na ativação de caspase-1 em resposta a sinais não microbianos (DAMPs) incluindo cristais de ácido úrico, ATP e substâncias particuladas, tais como amianto e sílica, dentre muitas outras (revisado por Franchi *et al.*, 2012; figura 10).

Foi proposto que, em alguns casos, a ativação do inflamassomo NLRP3 requer dois sinais. O primeiro é providenciado por moléculas microbianas tais como LPS (sinalizando via TLR4) ou MDP (sinalizando via Nod2). Esta etapa é importante porque induz a expressão dos componentes que serão utilizados na montagem e ativação do inflamassomo em um segundo momento, tais como NLRP3, pro-caspase-1, pro-IL-1 β , pro-IL-18. O segundo sinal vem dos agonistas de NLRP3, como ATP extracelular ou moléculas formadoras de poros, como toxinas bacterianas (Bauernfeind & Hornung, 2013). A ativação de NLRP3, com agregação da proteína adaptadora ASC e ativação de caspase-1, resulta na clivagem de pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas ativas.

O papel fisiológico para ATP na ativação de NLRP3 permanece controverso, uma vez que altas concentrações de ATP, que não são normalmente encontradas no ambiente extracelular, são necessárias para aumentar a produção de IL-1 β . Em ausência de pré-estimulação com PAMPs, ATP não ativa caspase-1, embora possa desencadear um intenso efluxo de K⁺ intracelular. ATP extracelular ativa o receptor P2X₇ e leva à abertura de um poro mediado por proteína hemi-canal panexina-1. Através desse poro ocorre efluxo de K⁺, com despolarização da membrana plasmática, inchaço celular e

esses eventos levam à ativação de NLRP3, de caspase-1 e liberação de IL-1 β e IL-18 (Becker and O'Neil, 2007).

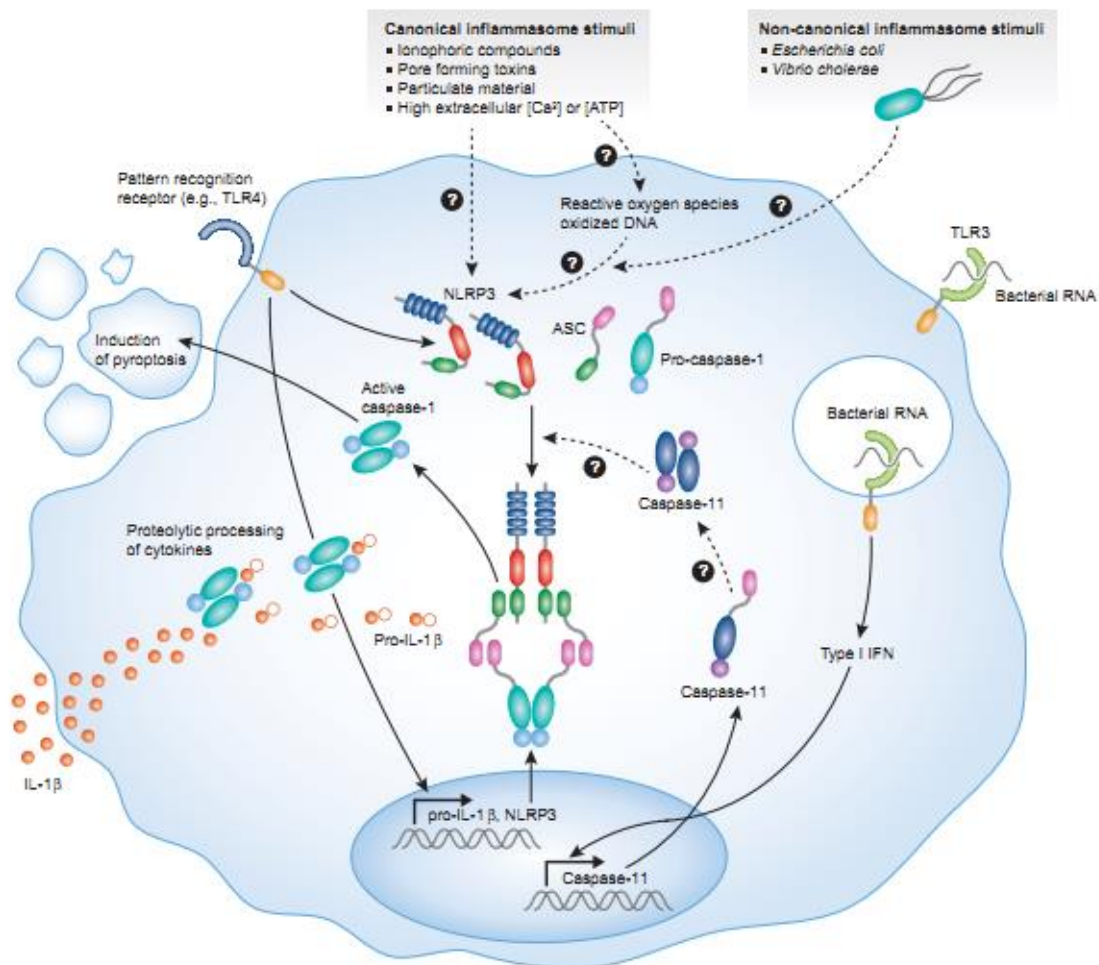


Figura 10: Ativação do inflamassomo NLRP3. NLRP3 pode ser ativado por patógenos e seus derivados ou por moléculas endógenas. Esses receptores encontram-se em seu estado inativo no citoplasma. Quando ocorre ativação sua estrutura se altera e ele é capaz de oligomerizar com outros receptores NLRP3 e se associar à proteína adaptadora ASC e com a enzima caspase-1. Esta estrutura é chamada de inflamassomo e é responsável por processos como morte celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Também é ilustrada a presença de caspase-11, entretanto, pouco se sabe sobre as vias que levam à ativação da mesma (Bauernfeind & Hornung, 2013).

Apesar de novas funções estarem sendo descobertas para os inflamassomos, desde sua descrição, em 2002, a principal característica deste complexo molecular é a geração de IL-1 β e IL-18 em suas formas maduras, secretadas para o meio extracelular. Os genes das citocinas IL-1 β e IL-18 pertencem à uma família de genes altamente conservados evolutivamente e consistindo de 11 membros: IL-1 α , IL-1 β , antagonista de receptor de IL-1, IL-18 (IL-1F4), IL-1F5-F10 e IL-33 (Smith, 2011).

Proteínas que serão secretadas, geralmente possuem um peptídeo sinal interno ou na porção amino-terminal que funciona como uma etiqueta, que endereçam-nas para o retículo endoplasmático (RE). Do lúmen do RE, estas proteínas são transportadas para o Golgi, empacotadas em vesículas secretórias que se fundem com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo no espaço extracelular. Essa via de secreção de proteínas é a chamada de via clássica ou via RE-Golgi (Lamkamfi, 2011).

Os membros da família IL-1 não possuem o peptídeo sinal, e assim não são exportados para o meio extracelular pela via secretória clássica, como ocorre com outras citocinas. Ao invés disso, IL-1 α , IL-1 β , IL-18 e IL-33 possuem um pro-domínio na região N-terminal, com cerca de 30 a 100 resíduos de aminoácidos. No caso de IL-1 β e IL-18, o pro-domínio serve como substrato para caspase-1, gerando então a citocina madura (Smith, 2011). O sítio de clivagem para caspase-1 está presente somente na pro-IL-1 β de mamíferos e está ausente nas sequências de outros vertebrados (Denes *et al.*, 2012).

IL-1 β é um dos mais potentes mediadores solúveis da inflamação. É produzida por vários tipos celulares, mas os estudos focam na produção por células imunes, principalmente por macrófagos (Denes *et al.*, 2012). Ela medeia diversos efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório, incluindo febre, hipotensão, hipersensibilidade a dor inflamatória e a liberação de hormônios adrenocorticotróficos (Johnston *et al.*, 2007).

Além disso, sinalizando via seu receptor, IL-1R, que está amplamente distribuído em muitos tipos celulares, induz a produção e secreção de outras citocinas, como IL-6, que induz leucocitose e trombocitose e síntese de proteínas de fase aguda, requeridas para sustentar a resposta inflamatória. Também induz IL-8, COX2, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (von Moltke *et al.*, 2013). IL-1 β atua como potente pirógeno endógeno e sua produção em excesso ou descontrolada pode causar danos aos tecidos hospedeiros e exacerbar patologias com componentes inflamatórios (Johnston *et al.*, 2007).

IL-18 não possui atividade pirogênica, diferentemente de IL-1 β . Atua sinergisticamente com IL-12 para estimular células NK e T citotóxicas a produzir INF γ , que possui um importante papel na eliminação de vírus. IL-18 está, portanto, associada ao desenvolvimento de respostas tipo Th1 (Hoshino *et al.*, 1999). Mas, em ausência de IL-12, induz respostas tipo Th2, por promover a secreção de IL-4, IL-5 e IL-10 (Dinarello, 2009). Ainda, IL-18 sinergiza com IL-23 para induzir a secreção de IL-17 por células Th17 (Weaver *et al.*, 2006).

Além das citocinas inflamatórias, vem sendo demonstrada a ligação entre inflamassomos e o metabolismo de lipídios, por exemplo, com liberação de mediadores lipídicos.

Eicosanóides são potentes moléculas bioativas, derivados de lipídios, como ácido araquidônico. Eles estão envolvidos em diversos fenômenos biológicos, como a produção de citocinas, diferenciação celular, proliferação, sobrevivência, migração, apresentação de antígenos e morte celular, dentre outros (Liu *et al.*, 2013).

Em 2012 ocorreu a primeira descrição da participação de inflamassomos na indução de mediadores lipídicos. Utilizando um modelo da doença inflamatória gota *in vivo* e *in vitro*, Amaral *et al* mostraram que a injeção de cristais de ácido úrico, um ativador do inflamassomo NLRP3, induziu a rápida liberação de leucotrieno B₄ e este foi importante para a produção de IL-1 β dependente de caspase-1. O mesmo aconteceu com macrófagos tratados com cristais de ácido úrico. O grupo conclui que LTB₄ modula a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por ácido úrico e estes radicais ativam o inflamassomo NLRP3.

Ainda em 2012, com um modelo *in vivo*, von Moltke *et al.* mostraram que a ativação dos inflamassomos NAIP5/NLRC4 por flagelina administrada por via intraperitoneal ou intravenosa induz morte dos camundongos após cerca de 30 minutos. Essa rápida resposta parece não estar associada à geração de IL-1 β /IL-18, mas sim ao que eles chamaram de "tempestade de eicosanóides", que são conhecidos por induzir perda de fluido vascular no intestino e na cavidade peritoneal. Os autores também mostram que os mecanismos que levam à essa produção de eicosanóides induzida por ativação de inflamassomo ocorre em função da ativação de caspase-1, que aumenta o influxo de cálcio, que ativa a enzima cPLA₂ e a biosíntese de eicosanóides, como tromboxano, PGD₂, PGE₂, 12-HETE, 15-HETE, LTB₄.

Ainda, foi visto que a ativação de Nod2 por MDP em macrófagos leva ao aumento da liberação de PGE₂, em função do aumento de COX₂ e PGE sintase. E o aumento da expressão de COX₂ é dependente de p38 MAPK e mediado por IL-1 β . Esse estudo mostra ainda que a ativação de Nod2 não altera as vias que levam à biosíntese de leucotrienos (Liu *et al.*, 2013).

A mais recente descrição da interação entre inflamassomos e metabolismo lipídico veio de um trabalho que mostra que a estimulação de macrófagos com ácidos graxos ômega 3 impede a ativação do inflamassomo NLRP3 e inibe ativação subsequente de caspase-1 e secreção de IL-1 β . Com isso, especula-se que estes ácidos graxos possam reprimir a inflamação e as doenças associadas, como gota, síndromes

autoimunes e outras doenças associadas à ativação do inflamassomo NLRP3 (Yan *et al.*, 2013).

Entretanto, o papel de inflamassomos em regular a produção de eicosanóides em processos inflamatórios induzidos por infecções micobacterianas não foi descrito até o presente momento.

2. Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas ricas em lipídios (figura 11) que apresentam diversas funções biológicas na homeostase e em patologias. São produzidos por praticamente todos os tipos celulares, mas são melhor caracterizados em células do sistema imune, tais como macrófagos, neutrófilos etc. Nestas células, tem sido mostrado o papel de CL em condições inflamatórias, onde servem como sítios de formação e/ou estoque de moléculas cruciais, como eicosanóides, enzimas e citocinas. São encontrados não somente em células eucarióticas, mas também em bactérias, fungos e plantas (revisado por D'Ávila *et al.*, 2006).

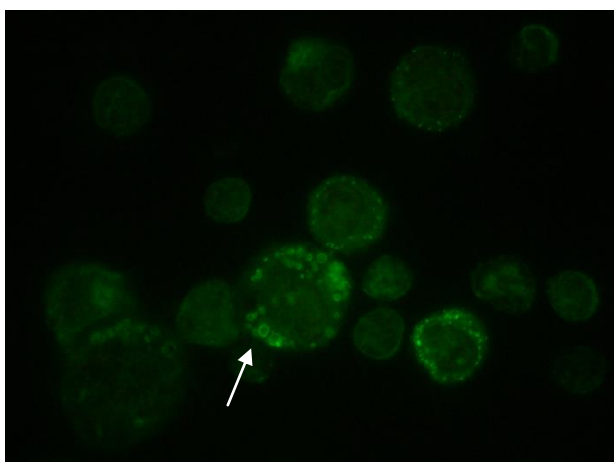


Figura 11: Corpúsculos lipídicos em macrófagos marcados com a sonda fluorescente verde Bodipy (arquivo próprio).

Estas organelas existem em pequeno número sob condições basais na células, mas podem ter número e/ou tamanho aumentados em resposta a diversos estímulos (tabela 1). O aumento do acúmulo de lipídios citoplasmáticos em leucócitos e outras células tem sido observado em diversas doenças infecciosas e inflamatórias, clínicas e experimentais, incluindo macrófagos na aterosclerose, leucócitos de articulações de pacientes com artrite inflamatória, lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome respiratória aguda, eosinófilos na inflamação alérgica, leucócitos peritoneais e

sanguíneos na sepse bacteriana, infecções micobacterianas e células cancerosas (revisado por Melo *et al.*, 2011).

<u>Estímulo</u>	<u>Tipo celular</u>
<i>Ácidos graxos</i> Insaturados, mas não saturados	Neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos
<i>Lipoproteínas</i> Ac-LDL/E-LDL/AGE-LDL/Ox-LDL, mas não LDL nativo	Macrófagos, mas não neutrófilos
<i>Moléculas derivadas de patógenos</i> LPS/LAM	Macrófagos, neutrófilos
<i>Mediadores lipídicos</i> PAF, mas não lisoPAF	Neutrófilos, eosinófilos e macrófagos
5-HETE	Neutrófilos
PGD ₂	Eosinófilos, mas não macrófagos
<i>Hormônios</i> Leptina, resistina	Macrófagos
<i>Citocinas/fatores de crescimento</i> IL-5, GM-CSF, IL-16	Eosinófilos
<i>Quimiocinas</i> RANTES/eotaxina/ eotaxina 2/ eotaxina 3	Eosinófilos
MCP-1	Macrófagos

Tabela 1: A formação de corpúsculos lipídicos é dependente de tipo celular e estímulo (Bozza *et al.*, 2009).

Corpúsculos lipídicos são organelas ativas funcionalmente e dinâmicas, que participam de diversos processos biológicos tais como metabolismo de lipídios, sinalização e ativação celular, tráfego de membrana, síntese e secreção de mediadores inflamatórios, dentre outros.

Diferentemente de organelas membranosas e vesículas citoplasmáticas, que tem um conteúdo aquoso cercado por bicamada fosfolipídica, os CLs são compostos de um centro rico em lipídios neutros, como triacilgliceróis, estéres de colesterol e diacilglicerol, cercado por monocamada de fosfolipídios com proteínas associadas (Melo *et al.*, 2011).

Na região central dos CLs são encontradas proteínas estruturais específicas conhecidas como proteínas da família PAT: Perilipina; ADRP (*adipose differentiation-related protein*, também chamada de adipofilina) e TIP47 (*tail-interacting protein*). Elas estão distribuídas diferentemente nos tecidos e células e suas expressões podem ser

aumentadas ou diminuídas em função das necessidades metabólicas das células (Roingeard, 2013). Essas proteínas tem sido implicadas na reunião e biogênese dos CLs (D'Ávila *et al.*, 2008). ADRP promove o estoque de colesterol e triglicérides e reduz o efluxo de colesterol. Além disso, pode atuar como centro para reunião de lipídios para formar novos CLs e aumentar a estabilidade da organela sob condições lipolíticas (Gross *et al.*, 2006).

Além destas proteínas constitutivas, podem ser encontradas nos CLs diferentes proteínas e enzimas dependendo do tipo celular e do estímulo que foi dado à célula. Com o auxílio de técnicas como identificação de proteínas em frações subcelulares ricas em corpúsculos lipídicos, imunodeteção de proteínas por microscopia eletrônica ou de luz tem sido mostrado que CLs compartimentalizam enzimas envolvidas na biosíntese, transporte e catabolismo de lipídios, proteínas envolvidas no transporte de vesículas, enzimas formadoras de eicosanóides, citocinas, quimiocinas e quinases envolvidas em sinalização celular (revisado por Bozza *et al.*, 2009, figura 12).

A via de formação destas estruturas não está bem estabelecida, mas existem dois modelos diferentes para explicar como estas organelas são formadas. No modelo clássico, lipídios neutros acumulam entre os folhetos citoplasmático e luminal das membranas do retículo endoplasmático, seguido do destacamento do CL envolvido por uma monocamada derivada do folheto citoplasmático da membrana do retículo (Murphy, 2001). Em outro modelo, derivado de estudos com eosinófilos humanos e outros leucócitos, CLs seriam formados por incorporação de múltiplas alças de membranas de retículo endoplasmático e o acúmulo de lipídios neutros ocorreria entre as membranas dentro dos CLs (Wan *et al.*, 2007). Ácidos graxos saturados não desencadeiam a formação de CLs, mas ácidos graxos *cis* insaturados são potentes indutores dos mesmos, sugerindo que a formação destas organelas envolve mais do que simples incorporação de lipídios exógenos (Bozza *et al.*, 1996, Moreira *et al.*, 2009). Uma vez formados, os CLs podem aumentar seu volume por síntese local de lipídios ou fusão entre eles (Melo *et al.*, 2011).

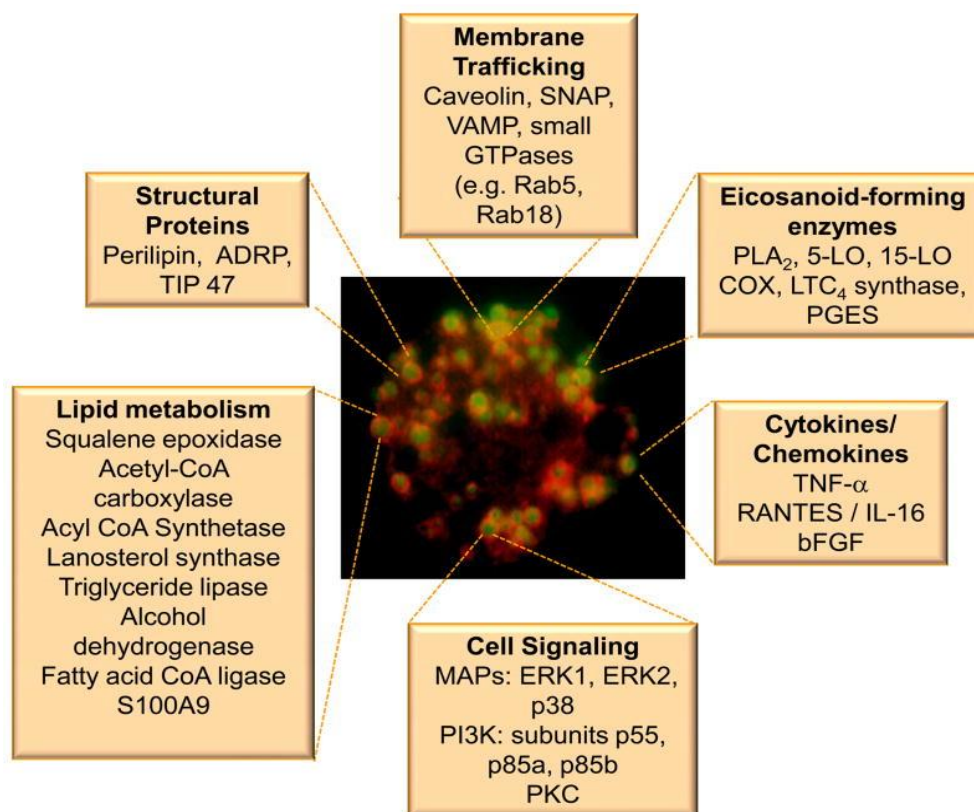


Figura 12: Proteínas que podem estar associadas aos corpúsculos lipídicos. De acordo com tipo celular e o estímulo utilizado, diferentes proteínas podem ser encontradas nos corpúsculos lipídicos. Essas proteínas participam de processos celulares como metabolismo lipídico, sinalização celular, tráfego de membrana e resposta inflamatória (Bozza *et al.*, 2009).

Esse processo de aumento de tamanho dos CLs pode ser facilmente compreendido se as organelas recém formadas permanecerem ancoradas ao retículo, onde proteínas e lipídios seriam capazes de se difundir. Se CLs já estiverem destacados do retículo, seus constituintes podem ser adquiridos por vesículas de tráfego intracelular, mas esta teoria esbarra no problema de como uma organela com uma bicamada de fosfolipídios se fundiria com outra que possui uma monocamada de fosfolipídios. Uma alternativa seria a produção local de lipídios no interior dos corpúsculos, via enzimas de metabolismo lipídico presentes nestas células (Roingeard, 2013).

Os lipídios presentes nos CLs podem ser requisitados para geração de energia pela atividade de lipases e outras enzimas metabólicas, em um processo conhecido como lipólise (Singh & Cuervo, 2012). Neste processo, os lipídios presentes nos corpúsculos, como os triaglicerídeos, são convertidos em produtos solúveis pela ação de duas lipases presentes na superfície dos corpúsculos, ATGL (*adipose triglyceride lipase*) e HSL (*hormone-sensitive lipase*) (Roingeard, 2013). Esta lipólise é dependente

de estímulos externos, que ativam PKA (proteína quinase A) e, conseqüentemente, a fosforilação das proteínas da família PAT.

Alternativamente, CLs podem ter seu conteúdo lipídico diminuído pelo fenômeno recentemente denominado de lipofagia. Neste processo, proteínas ATG (*autophagy-related genes*) atuam em conjunto formando um autofagossomo que entrega seu conteúdo rico em lipídios para lisossomos (Singh & Cuervo, 2012).

Corpúsculos lipídicos são sítios de localização de enzimas chaves envolvidas no metabolismo do colesterol e na síntese de ácidos graxos. Entretanto, ainda não se sabe ao certo a origem das proteínas dos CLs, nem como elas aderem ou se inserem na monocamada de fosfolipídios.

Tem sido mostrado que patógenos, como *M. tuberculosis* (Russel *et al.*, 2009), *M. bovis* BCG (D'Ávila *et al.*, 2006), *T. cruzi* (Melo *et al.*, 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (Plotkowski *et al.*, 2008), vírus da hepatite C (Miyanari *et al.*, 2007) entre outros, podem utilizar os lipídios presentes nos corpúsculos, favorecendo, em alguns casos, sua persistência e replicação (Mattos *et al.*, 2011b).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram negativa envolvida, principalmente em processos infecciosos nosocomiais. Em estudo com células epiteliais respiratórias foi visto que *P. aeruginosa* induz uma menor quantidade de CLs, mas uma maior quantidade de PGE₂ liberada e esta se localizava nos CLs. Os autores sugerem que a redução de CLs observada nas células infectadas foi devido ao consumo de lipídios para geração deste prostanóide (Plotkowski *et al.*, 2008).

Um exemplo da forte interação entre CLs e um agente patogênico foi observado por Mattos *et al.* (2011), em que CL tem sua formação induzida por *Mycobacterium leprae*, sendo recrutados para fagossomos de células de Schwann contendo *M. leprae* de maneira independente de TLR2. Este trabalho mostrou também a co-localização entre CLs e *M. leprae* em biópsias de nervos de pacientes com lepra lepromatosa e que a inibição do recrutamento de CLs diminui a sobrevivência de *M. leprae* dentro das células de Schwann.

Outro trabalho mostrou que TLR6, e não TLR2, a exemplo do que acontece com outras micobactérias como *M. bovis* BCG (D'Ávila *et al.*, 2006), está envolvido na interação entre *M. leprae* e células de Schwann, favorecendo fagocitose e biogênese de corpúsculos lipídicos (Mattos *et al.*, 2011b). Neste trabalho também foi visto aumento na liberação de PGE₂ e de IL-10, que favorecem a inibição das atividades microbicidas de células de Schwann. Com isso, os autores concluíram que ocorre uma supressão da

resposta inflamatória desencadeada pela ativação de TLR6, com fenótipo antiinflamatório que é dependente da biogênese de corpúsculos lipídicos.

Diversos estudos tentam elucidar os mecanismos que levam à biogênese dos CLs. Pacheco *et al* (2002) demonstraram que a formação de CLs induzida por LPS é dependente de TLR4, PRR pelo reconhecimento deste componente da parede bacteriana de bactérias gram-negativas.

Sendo os macrófagos fagócitos profissionais, D'Ávila *et al* (2006) tentaram avaliar a influência da fagocitose na biogênese dos corpúsculos lipídicos. Foi visto que após infecção com *M. bovis* BCG mais de 95% das células apresentavam CLs, enquanto menos de 30% continham bacilos em seu interior. Além disso, a fagocitose de partículas de látex, *Bacillus subtilis* e da bactéria não patogênica *Mycobacterium smegmatis* não foram capazes de desencadear a formação de CLs. Juntos, estes resultados demonstram que a fagocitose não é suficiente nem essencial para a síntese de CLs. Este mesmo estudo também identificou que componentes de parede bacteriana, como LPS de *E. coli* ou lipoarabinomanana (componente purificados de parede - LAM) de *M. tuberculosis* podem induzir biogênese de CLs.

Em infecções micobacterianas, vários membros da família TLR podem participar do reconhecimento de antígenos. Nem o BCG nem o LAM não foram capazes de induzir a formação de CLs em macrófagos de animais deficientes em TLR2, sugerindo um papel importante deste receptor na biogênese dos corpúsculos (D'Ávila *et al*, 2006 e 2007). Ao mesmo tempo, a estimulação de macrófagos com zimosan, potente agonista de TLR2, não conseguiu estimular a biogênese de CLs, sugerindo que a ativação de TLR2 é essencial para a formação de CLs induzida por micobactéria, mas não é a única via participante deste processo (D'Ávila *et al*, 2006).

Além da participação de TLRs descrita acima, também já foi visto o envolvimento de receptores dectina-1, um tipo de receptor de reconhecimento de padrão na formação de CL induzida pelo fungo *Histoplasma capsulatum* (Sorgi *et al.*, 2009).

Outros receptores, tais como os NLRs ou co-fatores parecem estar associados à TLR2 para o reconhecimento de micobactérias (Ferwerda *et al.*, 2005). Entretanto, nada foi descrito até o momento sobre o envolvimento de NLRs na formação de corpúsculos lipídicos.

Uma das respostas desencadeada por infecções micobacterianas é a geração de mediadores lipídicos. Diversos componentes envolvidos na biosíntese de eicosanóides tem sido evidenciados nos CLs. Um dos precursores da formação de eicosanóides, o ácido araquidônico, enzimas responsáveis pelo seu processamento, como ciclooxigenase

e 5-lipoxigenase e os produtos destas enzimas estão presentes nos corpúsculos. Isso indica que um aumento no número de corpúsculos pode resultar em quantidade maior de eicosanóides, como PGE₂ e LTB₄, liberados. Também foi visto que alguns estímulos que induzem a produção de eicosanóides em leucócitos, incluindo ativadores da via de PKC, o próprio ácido araquidônico e fator ativador de plaquetas, são também capazes de estimular a formação de corpúsculos lipídicos (revisado por Bozza *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos sugerem que PGE₂ endógeno derivado de CLs regula negativamente a resposta de macrófagos, por inibir a produção de TNF α induzida por micobactéria, aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, diminuir apresentação de antígeno e a produção de radicais livres. Portanto, a inibição de CLs ou da produção desta prostaglandina teria efeitos benéficos para o hospedeiro no controle da infecção (D'Ávila *et al.*, 2006 e 2008b).

Consistente com o resultado acima está o trabalho que mostra que a ativação de PPAR γ aumenta a produção de PGE₂ em macrófagos infectados com *M. bovis* BCG (Almeida *et al.*, 2009). PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) é um membro da superfamília de receptores nucleares regulados por lipídios que desempenha um importante papel na modulação de processos celulares como, diferenciação, proliferação, inflamação e metabolismo de lipídios (Moraes *et al.*, 2006). Atualmente sabe-se que micobactérias aumentam a expressão deste receptor, que atua como fator de transcrição, e isso é um dos fatores que leva à biogênese de CLs. Somando-se ao aumento de prostaglandina citado acima e à diminuição do *killing* bacteriano, forma-se um ambiente que regula negativamente a resposta dos macrófagos à micobactéria, sugerindo que a expressão de PPAR γ contribui para o estabelecimento da infecção crônica (revisado por Almeida *et al.*, 2012).

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Muitos receptores estão envolvidos na resposta imune à micobactérias (figura 13). Eles estão presentes na superfície celular, em fagossomos e no citosol, sugerindo que interações em cada compartimento são importantes na resposta do hospedeiro a esses patógenos. A sinalização desencadeada por alguns deles leva à geração de citocinas pro-inflamatórias (TLRs, NLRs etc) e de outros leva à supressão da resposta imune (DC-SIGN e receptor de manose). A integração das vias é característica da resposta imune inata e pode influenciar a imunidade adaptativa (Huynh *et al.*, 2011).

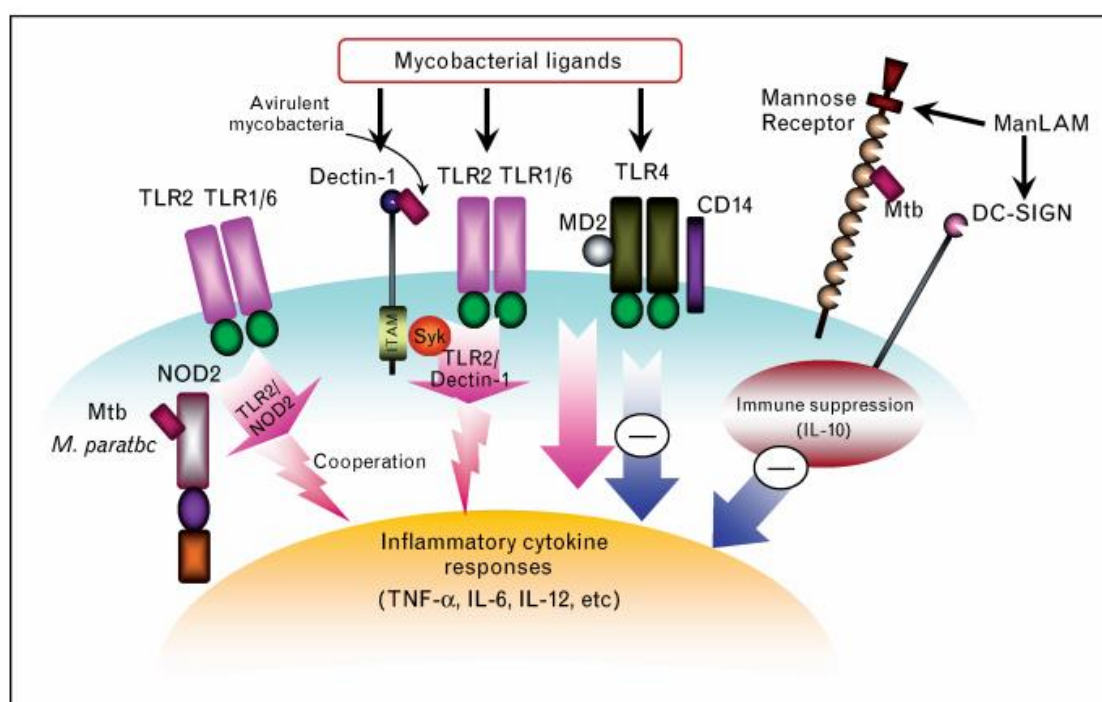


Figura 13: Participação de receptores da imunidade inata no reconhecimento de micobactérias em macrófagos. Diversos receptores como TLRs, dectina-1, Nod2 estão envolvidos na resposta à micobactérias que levam à ativação do sistema imune. Ainda pode ocorrer ativação de receptores de manose e DC-SIGN, que levam respostas imuno supressoras (Jo, 2008).

Citocinas pro-inflamatórias da família IL-1 desempenham um importante papel nos mecanismos de defesa anti-micobacterianos do hospedeiro. Camundongos deficientes em IL-1 são mais susceptíveis à formação de granuloma em infecções por *M. tuberculosis* (Juffermans *et al.*, 2000). Camundongos deficientes em IL-1R1 e inoculados com *M. tuberculosis* por via aerogênica tem maior carga micobacteriana nos pulmões que animais selvagens (Juffermans *et al.*, 2000). Um estudo recente mostrou que a indução da produção de IL-1 β por *M. tuberculosis* é mediada por TLR2/6 e Nod2,

enquanto caspase-1 é constitutivamente ativada em monócitos primários humanos (Kleinnijenhuis *et al.*, 2009).

Em estudos realizados em nosso laboratório, foi visto que TLR2 é importante, mas não o único receptor envolvido na biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com *M. bovis* BCG (D'Ávila *et al.*, 2006). Outro trabalho mostrou que, na ausência de TLR2 e TLR4 ainda existe liberação de quantidades significativas de citocinas em resposta à *M. tb*, indicando a presença de outras vias de sinalização que desencadeiam produção de citocinas (Ferwerda *et al.*, 2005).

Além disso, foi recentemente demonstrado que a formação de CLs, a produção de PGE₂ e expressão de PPAR γ em macrófagos infectados com *M. bovis* BCG requer a presença de CD36 e TLR2, demonstrando uma interação entre esses receptores (Almeida *et al.*, 2014). Alguns trabalhos sugerem colaboração entre receptores, mesmo entre TLRs e NLRs, na montagem de uma resposta imune eficiente (Ferwerda *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006).

Além desse conhecido envolvimento de receptores da imunidade inata no reconhecimento de micobactérias e de *M. bovis* BCG ser o modelo de estudo de boa parte destes trabalhos, sabemos também que esta bactéria é capaz de induzir liberação de IL-1 β e induzir formação de corpúsculos lipídicos. Esses CL são utilizados para evadir as defesas do hospedeiro, favorecendo o crescimento e persistência da micobactéria.

Até o momento, nada foi descrito sobre uma possível interação entre essas duas plataformas extremamente envolvidas com a resposta inflamatória: corpúsculos lipídicos e inflamassomos.

Nossa hipótese é que os receptores tipo Nod possam participar da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BCG, de maneira similar ao que acontece com TLR2 (D'Ávila *et al.*, 2006). Além disso, especulamos que os corpúsculos lipídicos possam servir de sítio de localização de proteínas envolvidas na via dos inflamassomos e proteínas relacionadas, participando da formação e/ou ativação de inflamassomos.

Na primeira parte do trabalho estudamos se a ausência de proteínas como Nod1, Nod2, Rip2, NLRP3, ASC, caspase-1, IL1-R1 e IL-18R afeta a formação de corpúsculos lipídicos, induzida por BCG, em macrófagos. Além disso, avaliamos o quanto a ausência destas proteínas afeta a liberação de IL-1 β e a geração de eicosanóides (figura 14).

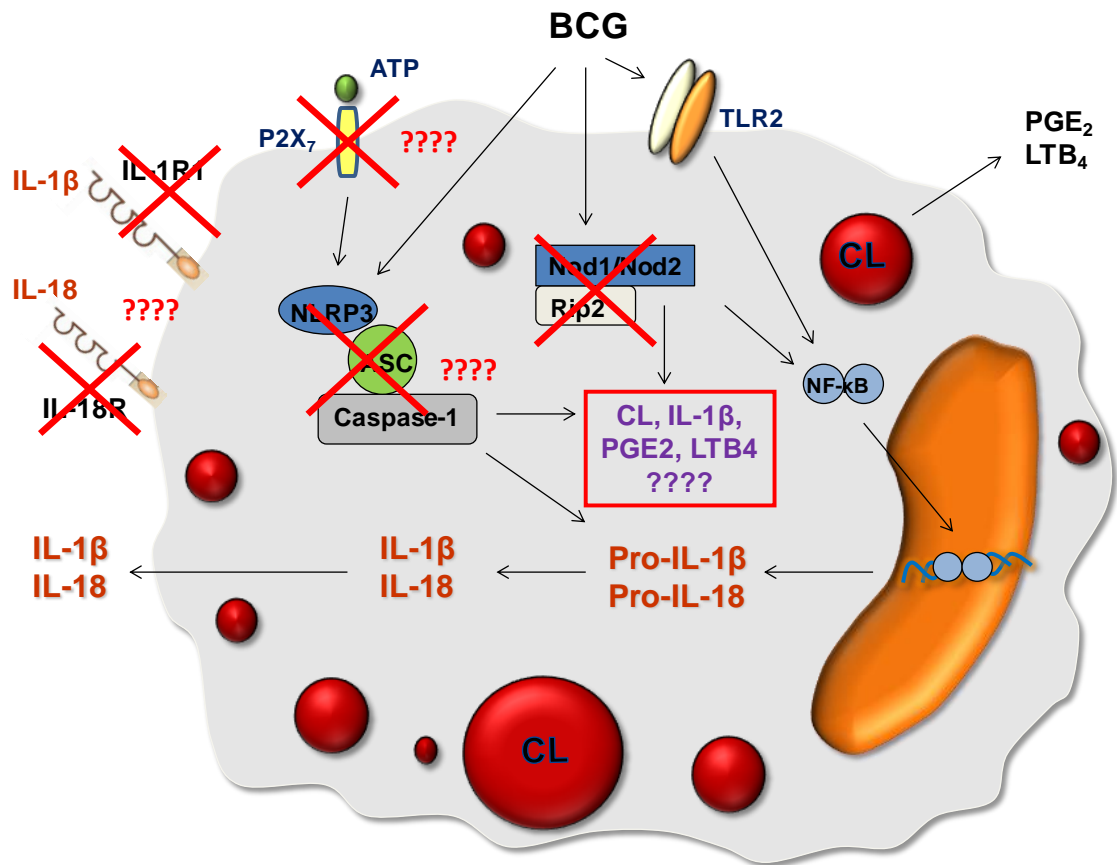


Figura 14: Desenho esquemático dos objetivos propostos para a primeira parte da tese. BCG e os componentes de sua estrutura podem ser reconhecidos por receptores como TLR2, Nod2 e NLRP3. A ativação da célula pela infecção leva à biogênese de corpúsculos lipídicos, a secreção de eicosanóides e geração de pro-IL-1 β e pro-IL-18, estas últimas, de maneira dependente de ativação de NF- κ B. Investigaremos se a ausência de Nod1, Nod2, Rip2, IL-1R1, IL-18R, ASC e caspase-1 e o bloqueio de NLRP3 e P2X₇ modularia a biogênese de corpúsculos lipídicos e a liberação de IL-1 β , PGE₂ e LTB₄.

Na segunda parte do trabalho, pesquisamos se algumas destas proteínas citadas acima estaria presente em corpúsculos lipídicos. Também inibimos a síntese destas organelas e verificamos se ocorre ativação de inflamassomos sob estas condições (figura 15).

OBJETIVO GERAL

Estudar a interação entre os inflamassomos e os corpúsculos lipídicos na infecção de macrófagos por *Mycobacterium bovis* BCG

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Avaliação da implicação dos receptores nod-like e de proteínas relacionadas na biogênese dos corpúsculos lipídicos**
- **Avaliar o papel dos corpúsculos lipídicos como sítio de compartimentalização de proteínas do complexo inflamassomo e o seu impacto na ativação dos inflamassomos e liberação de mediadores inflamatórios**

METODOLOGIA

Animais

Camundongos C57BL/6 selvagens, pesando 20-25g, machos, foram obtidos na Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22-24°C), luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), com livre acesso à água e ração. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA N° L002/08). Também utilizamos animais deficientes para algumas proteínas de interesse deste estudo. Experimentos com macrófagos Nod1^{-/-} (Chamaillard *et al.*, 2003), Nod2^{-/-} (Kobayashi *et al.*, 2002), Rip2^{-/-} (Kobayashi *et al.*, 2002), Caspase-1^{-/-} (Li *et al.*, 1995), ASC^{-/-} foram realizados com animais gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr^o Dario Zamboni (USP/Ribeirão Preto). Os experimentos com macrófagos IL-1R1^{-/-} (Labow *et al.*, 1997), IL-18R^{-/-} (Hoshino *et al.*, 1999) foram realizados durante atividades realizadas no laboratório de Imunologia Molecular e Embriologia do CNRS/Orléans/França, sob coordenação de Dr^a Valérie Quesniaux e Dr^o Bernhard Ryffel.

***Mycobacterium bovis* BCG**

Ampolas de *Mycobacterium bovis* BCG (cepa Moreau) (Fundação Ataulpho de Paiva, Brasil) (Andrade *et al.*, 2005) foram mantidas a 4°C e o liofilizado foi hidratado em salina com 0,05% de tween 80 (Sigma) imediatamente antes do uso. A suspensão de BCG foi centrifugada três vezes a 10000 x g, por 5 minutos, 20°C, com subsequentes lavagens em salina com 0,05% tween 80 (diminui a formação de grumos de bacilos) para retirada do glutamato de sódio. Após a última ressuspensão em salina com tween, o BCG foi passado em seringa com agulha de 29G, 10 vezes e sonicado por 30 segundos para desfazer os grumos bacterianos.

Diferenciação de Macrófagos a partir de Medula Óssea Murina

Camundongos foram eutanaziados e tiveram seus ossos das patas traseiras removidos (fêmures e tíbias), epífises cortadas e as medulas ósseas removidas por lavagem com meio de cultura BMM: 48% RPMI 1640 (Gibco), 20% SFB (soro fetal

bovino - Gibco), 30% de sobrenadante de célula L929 (rico em M-CSF, citocina que estimula a diferenciação de macrófagos), 1% L-glutamina (Gibco), 1% Penicilina/Estreptomicina (P/S) (HyClone). As células foram homogeneizadas para desfazer os grumos, contadas com líquido de Turk (2% ácido acético em PBS + cristal violeta) e 4×10^6 células foram colocadas em placa de Petri comuns com 10mL de BMM. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. Após 3 dias de cultivo, as placas receberam adição de 10mL de BMM. Após mais 3 dias de incubação, os sobrenadantes foram desprezados e os macrófagos já diferenciados foram removidos das placas por lavagem com PBS 1X gelado, contados e plaqueados em placa de 24 poços ($0,5 \times 10^6$ células/poço), placas de 6 poços (2×10^6 células/poço), garrafas de 175cm² (20×10^6 células/garrafa). Para o plaqueamento foi utilizado meio RPMI 1640 com 2% SFB, 1% L-glutamina, 1% P/S, e as células plaqueadas foram mantidas em repouso na estufa por 48h antes de iniciar a infecção.

Infecção e Estimulação dos Macrófagos

Após repouso de 48 horas, os macrófagos foram lavados duas vezes com PBS 1X e expostos ao BCG (MOI 1,6:1) ou à inibidores e outros estímulos utilizados neste trabalho: ATP, BBG, Glibenclamide (Gliburídeo), LPS (todos da Sigma), C75 (Cayman). Após o tempo estabelecido de estímulo, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados para remover os restos celulares e congelados para realização de dosagens de citocinas e eicosanóides. Com as células, após duas lavagens com PBS 1X, realizamos testes de viabilidade celular com solução de azul de tripan 0,04%. Em todos os experimentos deste trabalho a viabilidade foi maior que 90%. As células foram utilizadas para citometria de fluxo, microscopia de fluorescência ou de campo claro, western blot, purificação de corpúsculos lipídicos.

Infecção *in vivo*

Os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 5×10^6 bacilos/cavidade e mantidos por 48 horas. Realizou-se então a lavagem dos peritôneos com 5mL de PBS gelado, contagem das células e distribuição de 10^5 células para citocentrifugação a 500 rpm, por 5 minutos, temperatura ambiente. Após a citocentrifugação, as células em lâminas de microscopia foram fixadas com formalina

3% por 10 minutos, temperatura ambiente e então, procedeu-se protocolo de marcação para microscopia de fluorescência.

Coloração com Tetróxido de Ósmio e Contagem de Corpúsculos Lipídicos

Após a infecção, as células em lamínulas foram fixadas com formalina 3,7% por, no mínimo, 10 minutos. Removeu-se a formalina das lamínulas e as mesmas foram lavadas com água destilada duas vezes. Seguiu-se a adição de 5 gotas de ácido cacodílico 0,1M (Sigma) e uma gota de tetróxido de ósmio (OsO_4 - TedPella) 1,5% e incubação por 30 minutos protegendo da luz. Ao fim deste tempo, as lamínulas foram lavadas duas vezes com água e incubadas por 3 minutos com TCH 50mg (tiocarbohidrazida- Sigma) em água. Após mais duas lavagens com água, as lamínulas foram incubadas novamente com ácido cacodílico e ósmio por 5 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia com auxílio de Entellan (Merck).

Procedeu-se, então a contagem dos corpúsculos lipídicos em microscópio óptico, com objetiva de 100X. Foram contadas 50 células em cada lamínula e cada variável foi feita em triplicata.

Imunofluorescência

Após fixação por 10 minutos com formalina 3%, as células foram lavadas com PBS, três vezes, por 5 minutos cada lavagem. A permeabilização das membranas celulares foi feita com PBS-Triton 0,1%, por 20 minutos, temperatura ambiente. Após três lavagens, houve o bloqueio de ligações inespecíficas com PBS-BSA 0,2% por 30 minutos, temperatura ambiente. Após uma lavagem de 10 minutos, as células foram incubadas com os anticorpos de interesse: anti-adipophilin (ADRP) 1:400 (Fitzgerald); anti-ASC 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-caspase-1 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-Nod2 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-IL-1 β 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-Rip2 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-Cryopirin NLRP3 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Santa Cruz Biotechnology). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS e incubados "overnight" a 4°C. As células foram lavadas três vezes por 5 minutos cada lavagem e seguiu-se incubação por 1h, temperatura ambiente, com anticorpos secundários: anti-guinea pig Cy2 (ADRP), rabbit anti-goat Cy3 1:4000 (para NLRP3), anti-rabbit Dylight 549 1:2000 (para todas as outras proteínas) (Jackson ImmunoResearch). Após três lavagens, as lâminas foram montadas com Prolong Gold com Dapi (Invitrogen) e observadas em microscópio confocal (Olympus FV10i-O). A análise das imagens foi

feita com software FV10-ASW 2.1). Os controles negativos foram feitos em células infectadas, submetidos ao mesmo protocolo de marcação, exceto pela omissão de anticorpo primário.

Algumas lamínulas também foram marcadas com o kit Flica caspase-1 (Immunochemistry), seguindo instruções do fabricante, para marcação de caspase-1 ativada.

Isolamento de Corpúsculos Lipídicos por fracionamento subcelular

20 x 10⁶ macrófagos foram cultivados em garrafas de 150cm², infectados, tripsinizados, centrifugados, lavados com PBS 1X e lisados em tampão TEE-KCl (25 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 1 mM EDTA and 5 mM EGTA / pH 7.4). Foi adicionado coquetel inibidor de proteases (*Complete® protease inhibitor cocktail* - Roche) e as células foram rompidas por cavitação em nitrogênio a 700 ψ (*psi*) por 15 minutos em gelo. Ao cavitado foi adicionado sacarose 1,08M. Após homogeneizar, foi adicionada, vagarosamente, sacarose 0,27M, seguida de sacarose 0,135M. O gradiente de sacarose foi centrifugado em ultracentrífuga (Optima Max-XP / Beckman Coulter) a 150 000 x g, 4°C, por 80 minutos (Brasaemle and Wolins, 2006). A ultracentrifugação em gradiente de sacarose gera sete frações subcelulares, conforme desenho abaixo:

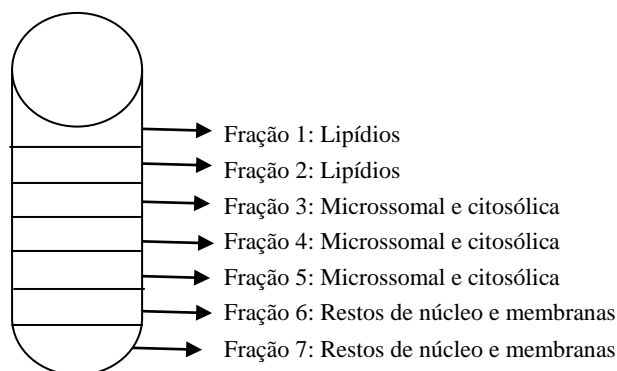


Figura 16: Esquema de fracionamento subcelular após ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

As frações foram recolhidas cuidadosamente e, com uma amostra de 20 μ L de cada uma, foi realizada a dosagem de LDH (lactato desidrogenase) com o kit CytoTox 96 (Promega), com leituras em 470nm nos tempos 0, 5, 10, 15, 25 e 35 minutos. Espera-se que nas frações 1 e 2 não haja variação na quantificação de LDH ao longo dos

tempos, pois LDH é uma enzima citoplasmática e estas frações são as ricas em lipídios e não devem possuir atividade desta enzima.

Como o objetivo é avaliar a presença de proteínas de interesse nas frações, deve-se realizar a precipitação de proteínas. Para isto, misturamos cada uma das frações ao ácido tricloroacético (TCA- Sigma) de forma a obter uma concentração final do mesmo de 10%. Agitamos vigorosamente as amostras e incubamos por 1 hora em gelo. Após este tempo, agitamos, centrifugamos a $7\ 500 \times g$, 4°C , 10 minutos. Desprezamos os sobrenadantes e ressuspendemos em acetona gelada, seguindo com agitações vigorosas, centrifugações e adições de acetona por mais duas vezes. Por fim, deixamos a acetona evaporar e ressuspendemos os pellets em tampão de corrida.

Western Blot

As frações celulares obtidas acima foram submetidas à western blot. Além disso, lisados celulares também foram feitos. As células foram lisadas com tampão de lise (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 10% glycerol (v/v), 10 mM DTT, 0.1 mM EDTA, inibidores de proteases). Os lisados celulares foram centrifugados a 13000 rpm, por 5 minutos, para remover os restos de células. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (para lisados celulares) ou gel gradiente de 7,5% e 12,5% (para frações celulares). Depois da corrida e de transferidas as amostras para membranas de nitrocelulose, as mesmas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) com 0,1% Tween 20 (TBS-T). As membranas foram incubadas com os anticorpos de interesse, "overnight", 4°C , sob agitação, diluídos em tampão de bloqueio: anti-adipophilin (ADRP) 1:500 (Fitzgerald); anti-ASC 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-caspase-1 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-Nod2 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-IL-1 β 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-Rip2 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-Cryopirin (NLRP3) 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Santa Cruz Biotechnology), anti- β -actina 1:15000 (Sigma). Seguiu-se lavagem das membranas com TBS-T (cinco vezes, dois minutos cada) e incubação das membranas com anticorpos secundários conjugados à HRP (horseradish peroxidase) em tampão de bloqueio, por uma hora, 4°C , sob agitação. Por fim, as membranas foram lavadas cinco vezes com TBS-T e três vezes com TBS, por dois minutos cada, e seguiu-se a detecção dos complexos antígeno-anticorpo com Supersignal Chemiluminescence (Pierce).

Avaliação de caspase-1 ativa

Após a infecção, células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (HyClone), lavadas novamente e marcadas com Flica Caspase-1 (Immunochemistry) seguindo instruções do fabricante. A leitura das amostras foi feita em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD), onde foram analisadas 10000 células.

Dosagens de citocinas por ELISA

As quantidades de IL-1 β , TNF- α , KC, IL-10 liberadas pelas culturas celulares foram avaliadas por ELISA, seguindo instruções do fabricante (Duo Set Kit, R&D Systems).

Quantificação de eicosanóides por EIA

Os níveis de PGE₂ e LTB₄ liberados pelas células foram dosados em sobrenadantes das culturas celulares livres de células por EIA, seguindo instruções do fabricante (Cayman Chemical).

Análises Estatísticas

Os resultados representam as médias \pm erros padrões das médias dos valores obtidos nos diferentes testes. As diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, sendo o valor de $P < 0,05$ tomado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

PARTE 1: Avaliação da implicação dos receptores nod-like e de proteínas relacionadas na biogênese dos corpúsculos lipídicos

Metas: Avaliar a cinética de formação de CL e ativação dos inflamassomos

1. Cinética de formação de corpúsculos lipídicos e ativação de inflamassomos em macrófagos derivados de medula óssea

Mesmo estudando corpúsculos lipídicos há anos, nosso grupo ainda não havia descrito a formação destas organelas inflamatórias em macrófagos derivados de medula óssea e infectados com *M. bovis* BCG. Tampouco foi demonstrada a ativação de inflamassomos em tais condições.

Sendo assim, inicialmente, avaliamos a dinâmica da biogênese de CL e liberação de IL-1 β ao longo de diferentes tempos de infecção, em macrófagos derivados de medula óssea, infectados com *M. bovis* BCG. A avaliação da ativação de inflamassomos foi feita com base na secreção de IL-1 β , dosada por ELISA, e na ativação de caspase-1 com a sonda fluorescente Flica, que se liga à caspase-1 ativa.

Observamos que após 4 horas de infecção já existe um aumento do número de CL em macrófagos infectados, esse aumento é mantido por 8, 24 e 48 horas de infecção (figura 17A).

Quanto à liberação de IL-1 β nos sobrenadantes das culturas celulares, vemos que a infecção com BCG induz secreção desta citocina em todos os tempos de infecção utilizados, mas o pico de liberação ocorre em 24 horas de infecção (figura 17B).

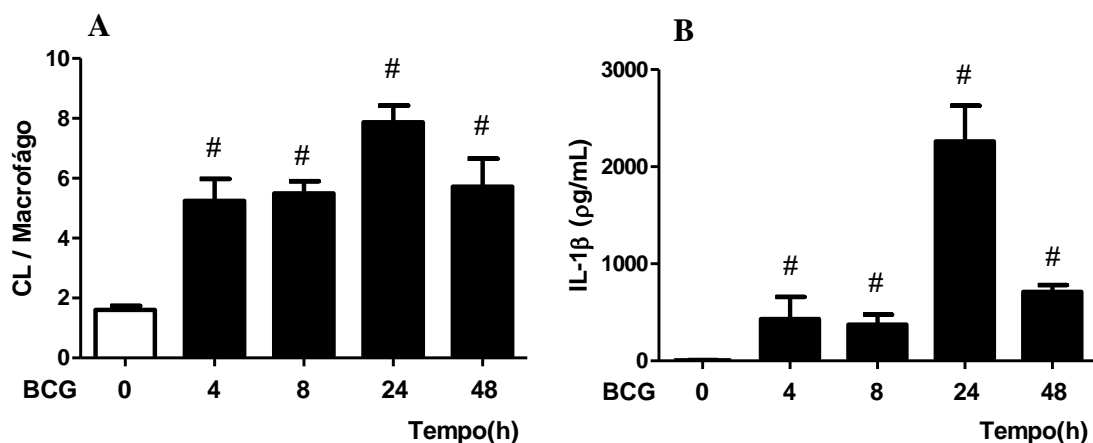


Figura 17: Cinética de formação de corpúsculos lipídicos e secreção de IL-1 β , após infecção por BCG. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados ou não por diferentes tempos, com *M. bovis* BCG. (A) As células foram coradas com tetróxido de ósmio e os corpúsculos contados por microscopia ótica. (B) Os sobrenadantes foram recolhidos e IL-1 β foi quantificada por ELISA. Os dados representam as médias \pm SEM dos resultados obtidos em, no mínimo, 3 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando os números de CL de células infectadas são comparadas com o de células não infectadas; e também quando são comparadas as dosagens de IL-1 β de células infectadas com as dosagens obtidas em células não infectadas.

A síntese e processamento de IL-1 β após infecção foi confirmada por western blot. Como observado na figura 18, em células não infectadas não há imunodeteção desta citocina, mas após infecção dos macrófagos por 24 horas com BCG ocorre expressão de pro-IL-1 β (31kDa) e também da forma clivada, de 17kDa.

Além de avaliarmos a ativação de inflamassomos pela síntese, processamento e liberação de IL-1 β , fizemos também ensaios para detectar caspase-1 ativada pelo método de Flica e análise por microscopia de fluorescência, em macrófagos derivados de medula, infectados ou não com BCG. Vemos na figura 19 que células não infectadas tem pouca marcação para caspase-1 ativada, mas células infectadas com BCG mostram intensa marcação com a sonda fluorescente, mostrando que a infecção é capaz de ativar a enzima.

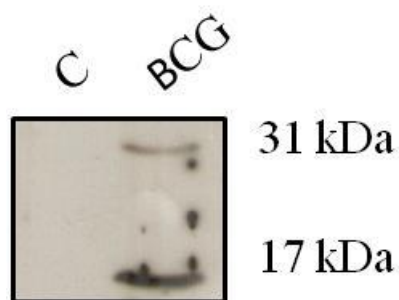


Figura 18: Expressão de IL-1 β intracelular. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados ou não por 24 horas com *M. bovis* BCG. As células foram lisadas e a expressão de IL-1 β foi avaliada por western blot.

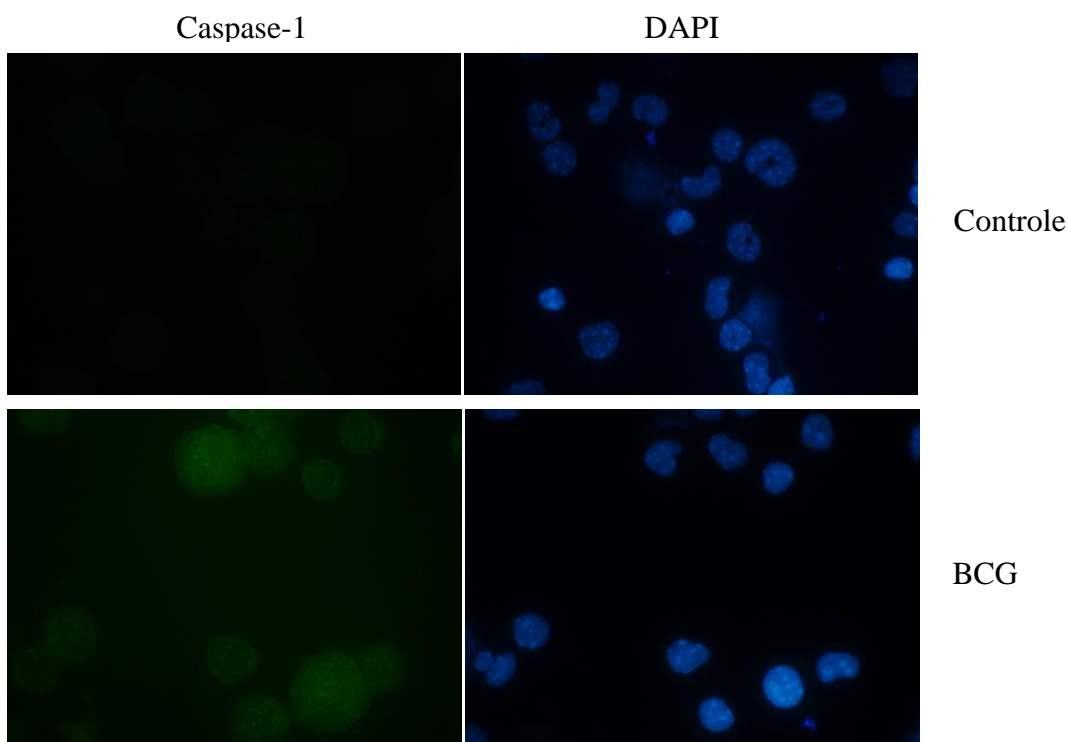


Figura 19: Avaliação de caspase-1 ativada após infecção por BCG. Macrófagos infectados ou não por 24 horas foram marcados com a sonda fluorescente verde Flica caspase-1, que se liga à caspase-1 ativa na célula. As imagens foram visualizadas em microscópio de fluorescência. Em azul vemos os núcleos das células marcados por DAPI.

Com os resultados de síntese, processamento e liberação de IL-1 β e de ativação de caspase-1 demonstramos a ativação de inflamassomos induzida por *M. bovis* BCG em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6.

Metas: Quantificar, após a infecção por BCG, os CL em macrófagos selvagens e deficientes em:

- Nod1, Nod2 e Rip2
- ASC, Caspase-1

Pesquisar a influência dos NLRs e de inflamassomos em uma das funções dos CL, a liberação de LTB₄ e PGE₂

2. As proteínas Nod1, Nod2 e Rip2 não interferem na biogênese de corpúsculos lipídicos

Diversos trabalhos relatam o envolvimento dos receptores Nod1 e Nod2 na resposta contra micobactérias (Ferwerda *et al.*, 2005; Kleinnijenhuis *et al.*, 2009). Um deles, mostra que as vias desencadeadas por Nod2 e TLR são não-redundantes no reconhecimento de *M. tuberculosis*, mas podem sinergizar para induzir uma resposta inflamatória intensa (Ferwerda *et al.*, 2005).

Brooks *et al.* (2011) mostraram que Nod2 é importante no controle da produção de citocinas e no crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos. Ainda neste trabalho, Nod2 foi envolvido no controle do crescimento de BCG em macrófagos humanos e murinos. A participação de Nod2 nestes processos é mediada pela secreção de TNF α e IL-1 β induzida pela ativação deste receptor.

Nosso laboratório já demonstrou a participação de receptores da imunidade inata, como TLR2, na formação de corpúsculos lipídicos induzida por *M. bovis* BCG (D'Ávila *et al.*, 2006). Mas esse parece não ser o único receptor envolvido na biogênese destas organelas lipídicas. Sendo assim, investigamos a participação dos receptores intracelulares da imunidade inata Nod1 e Nod2 e da proteína adaptadora da via destes receptores, Rip2, na indução de corpúsculos lipídicos por BCG.

Para isso usamos macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou deficientes para Nod1, Nod2 ou Rip2, infectados com *M. bovis* BCG por 24 horas. Observamos que o número de CLs é aumentado em células infectadas dos grupos selvagens e deficientes nas três proteínas estudadas, em relação às células controles, mas não existe diferença significativa na quantidade dessas organelas entre as células infectadas destes grupos (figura 20). Houve uma tendência à diminuição do número de CLs em células Nod2^{-/-} infectadas, em relação às células infectadas de animais selvagens, mas essa diminuição não foi estatisticamente significativa. Em conjunto, estes resultados sugerem que estas proteínas não participam da biogênese de CL.

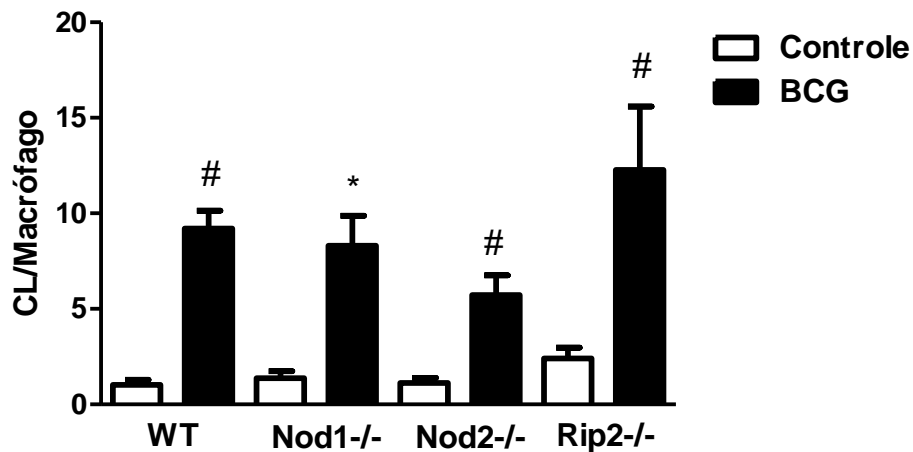


Figura 20: Nod1, Nod2 e Rip2 não modulam formação de corpúsculos lipídicos induzida por BCG. Macrófagos derivados de medula óssea de diferentes animais deficientes ou selvagens foram infectados ou não (controle) com *M. bovis* BCG por 24 horas. O número de corpúsculos lipídicos foi avaliado por contagem após coloração com tetróxido de ósmio. Os dados representam as médias \pm SEM de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. *, $p < 0,01$, quando células Nod1 deficientes infectadas foram comparadas com células deste mesmo grupo não infectadas. #, $p < 0,001$, quando células infectadas de animais selvagens e de animais Nod2^{-/-} e Rip2^{-/-} foram comparadas com células destes mesmos grupos não infectadas.

2.1: A ativação de inflamassomos não foi modificada em macrófagos de animais deficientes de Nod1, Nod2 e Rip2

A vasta quantidade de estudos na área de NLRs nos mostra que os receptores Nod1 e Nod2 não formam um inflamassomo clássico, pois não se reúnem com ASC e caspase-1 para a liberação de IL-1 β . Isso se confirma no nosso modelo. Vimos que a infecção de macrófagos derivados de medula óssea, infectados com BCG por 24 horas, liberam grande quantidade de IL-1 β , indicando que ocorre ativação de inflamassomos nestas condições. Conforme observado na figura 23 quando comparamos com células infectadas de animais deficientes em Nod1, Nod2 e Rip2, vimos uma liberação similar de IL-1 β , mostrando que essas proteínas não estão envolvidas na ativação de inflamassomos e liberação desta citocina pro-inflamatória em nosso modelo de estudo (figura 21).

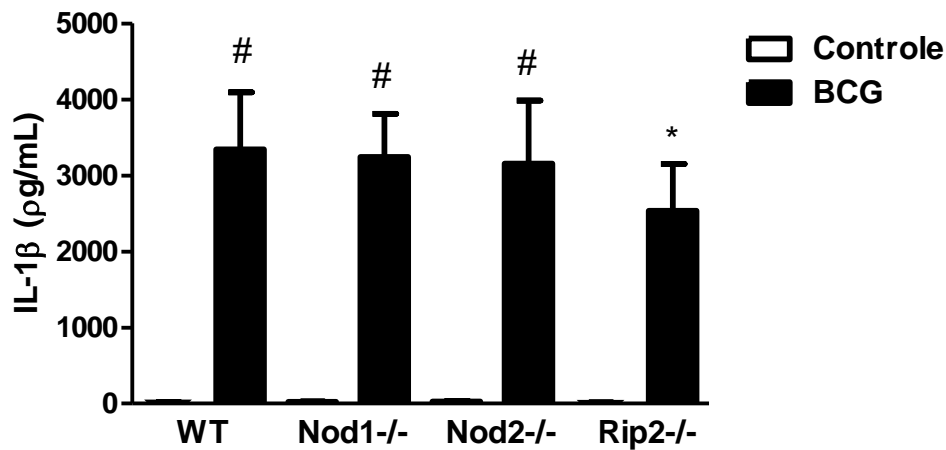


Figura 21: Liberação de IL-1 β em macrófagos selvagens ou deficientes em Nod1, Nod2 e Rip2, infectados por BCG. Macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou deficientes em Nod1, Nod2 e Rip2 foram infectados ou não (controle) com BCG por 24 horas. Os sobrenadantes das culturas celulares foram utilizados para avaliação da liberação de IL-1 β por ELISA. Os dados representam as médias \pm SEM de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. *, $p < 0,01$, quando células Rip2^{-/-} infectadas foram comparadas com células deste mesmo grupo não infectadas. #, $p < 0,001$, quando células infectadas de animais selvagens e de animais Nod1^{-/-} e Nod2^{-/-} foram comparadas com células destes mesmos grupos não infectadas.

2.2: A liberação de mediadores lipídicos não é alterada pela deficiência em Nod1, Nod2 e Rip2

Visto que recentemente começou a ser descrita o envolvimento entre receptores tipo Nod e eicosanóides, buscamos avaliar se, em nosso modelo, as proteínas Nod1, Nod2 e Rip2 teriam influência na liberação dos importantes mediadores lipídicos PGE₂ e LTB₄.

Notamos pela figura 22A, que a infecção por BCG induz liberação de PGE₂ e que esta é similar em células WT e Nod1^{-/-}, Nod2^{-/-} e Rip2^{-/-}. Já na figura 22B vimos que não há liberação de quantidades significativas de LTB₄ em células não infectadas ou infectadas com BCG por 24 horas em todos os grupos de macrófagos estudados.

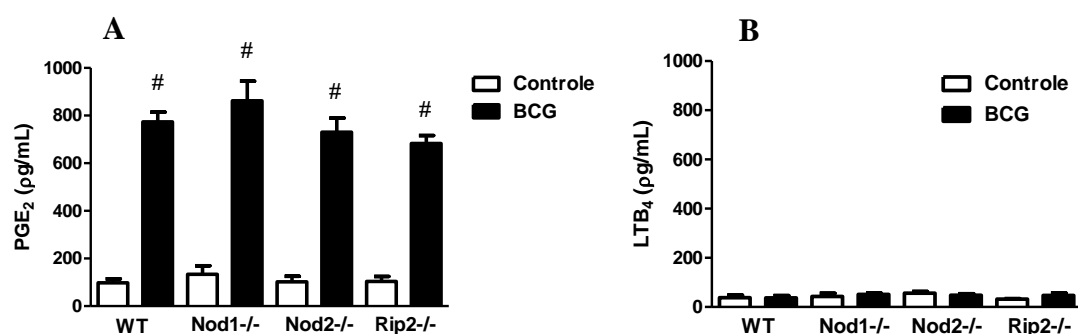


Figura 22: Dosagem de PGE₂ (A) e LTB₄ (B). Os sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou Nod1^{-/-}, Nod2^{-/-} e Rip2^{-/-} infectados ou não com BCG por 24 horas foram avaliados por EIA. Os dados representam as médias ± SEM de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. #, p<0,001, quando macrófagos infectados de animais selvagens e Nod1^{-/-}, Nod2^{-/-} e Rip2^{-/-} foram comparados com macrófagos destes mesmos grupos não infectados.

Esse bloco de resultados sobre corpúsculos lipídicos, liberação de IL-1 β e geração de mediadores lipídicos inflamatórios nos leva à concluir que os receptores Nod1, Nod2 e a proteína adaptadora Rip2 não tem relação com a biogênese de corpúsculos induzida por BCG. Além disso, a ativação de inflamassomos induzida por BCG acontece independentemente destas proteínas e a liberação de eicosanóides também.

3. A formação de corpúsculos lipídicos é potencializada em macrófagos de animais ASC^{-/-} e caspase-1^{-/-}

Os inflamassomos clássicos são compostos por um membro da família de receptores tipo Nod, a proteína adaptadora ASC e a enzima caspase-1, responsável pelo processamento das pro-formas das citocinas IL-1 β e IL-18.

Além da busca por receptores envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos, avaliamos também se ASC e caspase-1 poderiam estar envolvidos neste fenômeno.

Vemos na figura 23A, que macrófagos derivados de medula óssea deficientes em ASC, infectados por 4 horas com BCG, geram um número superior de corpúsculos que macrófagos de animais selvagens.

Já na figura 23B, temos que macrófagos deficientes para caspase-1, infectados por 48 horas, produzem maior número de corpúsculos lipídicos que macrófagos de animais selvagens.

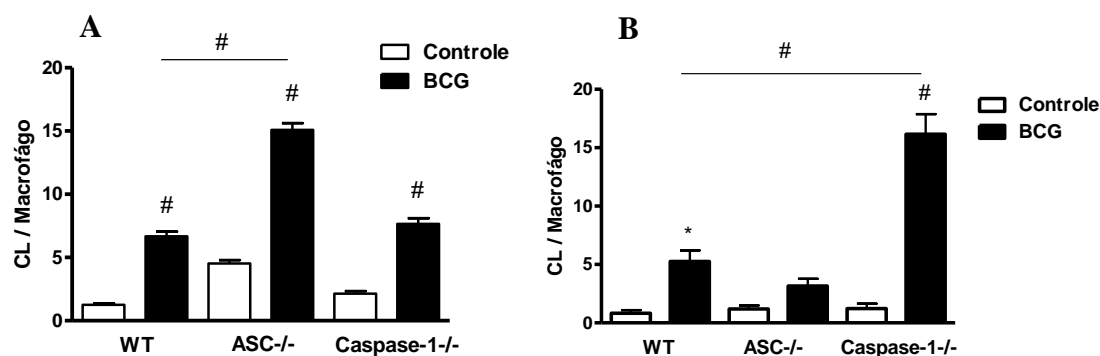


Figura 23: ASC e caspase-1 influenciam a formação de corpúsculos lipídicos em diferentes tempos de infecção. Macrófagos derivados de medula óssea de animais ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} ou selvagens foram infectados ou não (controle) com *M. bovis* BCG por 4 horas (A) ou 48 horas (B). O número de corpúsculos lipídicos foi avaliado por contagem após coloração com tetróxido de ósmio. Gráficos representativos com as médias ± SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. *, p<0,05, quando células WT infectadas por 48 horas são comparadas com células WT não infectadas. #, p<0,001, quando células infectadas por 4 horas de animais selvagens e deficientes em ASC e caspase-1 foram comparadas com células destes mesmos grupos não infectadas; também quando são comparadas células infectadas ASC^{-/-} com células infectadas WT após 4 horas de infecção; também quando células caspase1^{-/-} infectadas por 48 horas são comparadas com células caspase-1^{-/-} não infectadas ou com células WT infectadas.

3.1: A ativação de inflamassomos é bloqueada em macrófagos deficientes em ASC e caspase-1

Existem alguns tipos de inflamassomos, uns que utilizam ASC como proteína adaptadora, outros não, no caso, por exemplo, de receptores tipo Nod que possuem um domínio CARD em sua estrutura. Estes receptores podem se ligar diretamente ao domínio CARD da caspase-1. Já caspase-1 é a principal enzima conhecida por clivar as pro-formas das citocinas IL-1 β e IL-18, gerando as formas maduras, prontas para ser liberadas para o meio extracelular.

Barber *et al.* (2010) mostraram que camundongos ASC^{-/-} e caspase-1^{-/-} infectados *in vivo* com *M. tuberculosis* continuam a apresentar IL-1 β no lavado broncoalveolar e nos pulmões. Mas esse mesmo trabalho mostra que macrófagos derivados de medula de animais ASC^{-/-} e caspase-1^{-/-} infectados *in vitro* não possuem secreção de IL-1 β . Os autores creditam essa diferença encontrada ao fato de, *in vivo*, haver células como neutrófilos que processam IL-1 β sem a necessidade de caspase-1, com atuação de elastase e quimase (Guma *et al.*, 2009).

Em nosso modelo, vimos que ambas as proteínas, ASC e caspase-1, são fundamentais para a secreção de IL-1 β , induzida, em macrófagos derivados de medula óssea, por BCG, em ambos os tempos de infecção, 4 e 48 horas (figuras 24A e B). Isso porque na ausência destas proteínas não ocorre liberação de IL-1 β .

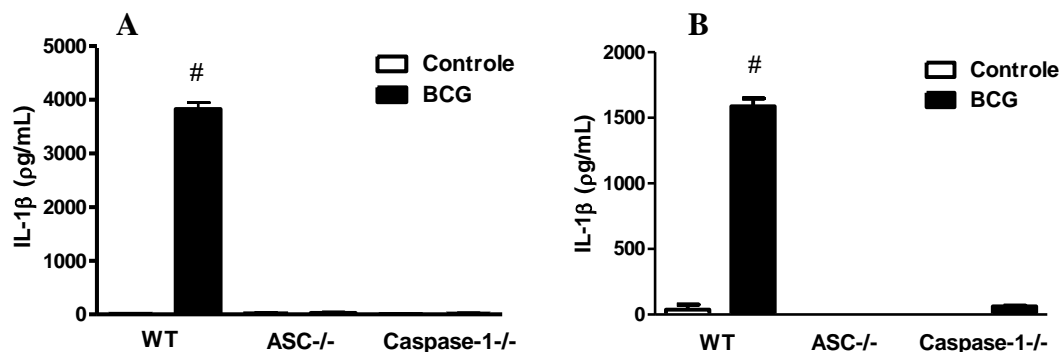


Figura 24: ASC e caspase-1 são fundamentais para liberação de IL-1 β em macrófagos infectados por BCG. Macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou deficientes em ASC e caspase-1 foram infectados ou não (controle) com BCG por 4 horas (A) ou 48 horas (B). Os sobrenadantes das culturas celulares foram utilizados para avaliação da liberação de IL-1 β por ELISA. Gráficos representativos com as médias \pm SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando células infectadas de animais selvagens foram comparadas com células deste mesmo grupo não infectadas.

3.2: A ausência de ASC e caspase-1 não modula a liberação de PGE₂ nem de LTB₄

Corpúsculos lipídicos são fonte de lipídios como ácido araquidônico e sítio de formação de eicosanóides. Uma vez que tivemos aumento do número de corpúsculos lipídicos em células deficientes em ASC e caspase-1 infectadas, investigamos se esse aumento teria influência sobre a liberação dos mediadores lipídicos PGE₂ e LTB₄, em células selvagens e deficientes em ASC e caspase-1.

Vemos nos gráficos abaixo que BCG aumenta a liberação de PGE₂ em macrófagos selvagens e essa liberação é similar em células ASC-/- e caspase-1-/- (figura 25A e C), mostrando que estas proteínas e o efeito delas sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos não afeta a secreção deste prostanóide.

De maneira similar à vista no bloco de resultados sobre Nod1, Nod2 e Rip2, LTB₄ não tem sua liberação alterada pela infecção com BCG, em macrófagos derivados de medula óssea, após 4 ou 48 horas de infecção (figura 25B e D). Notamos ainda que a produção de LTB₄ é muito baixa se comparada à de PGE₂.

Dessa maneira, concluímos que a ausência de ASC e caspase-1 favorece a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados por BCG. Essas proteínas são fundamentais para a ativação de inflamassomos em nosso modelo e não participam de forma importante na liberação de eicosanóides

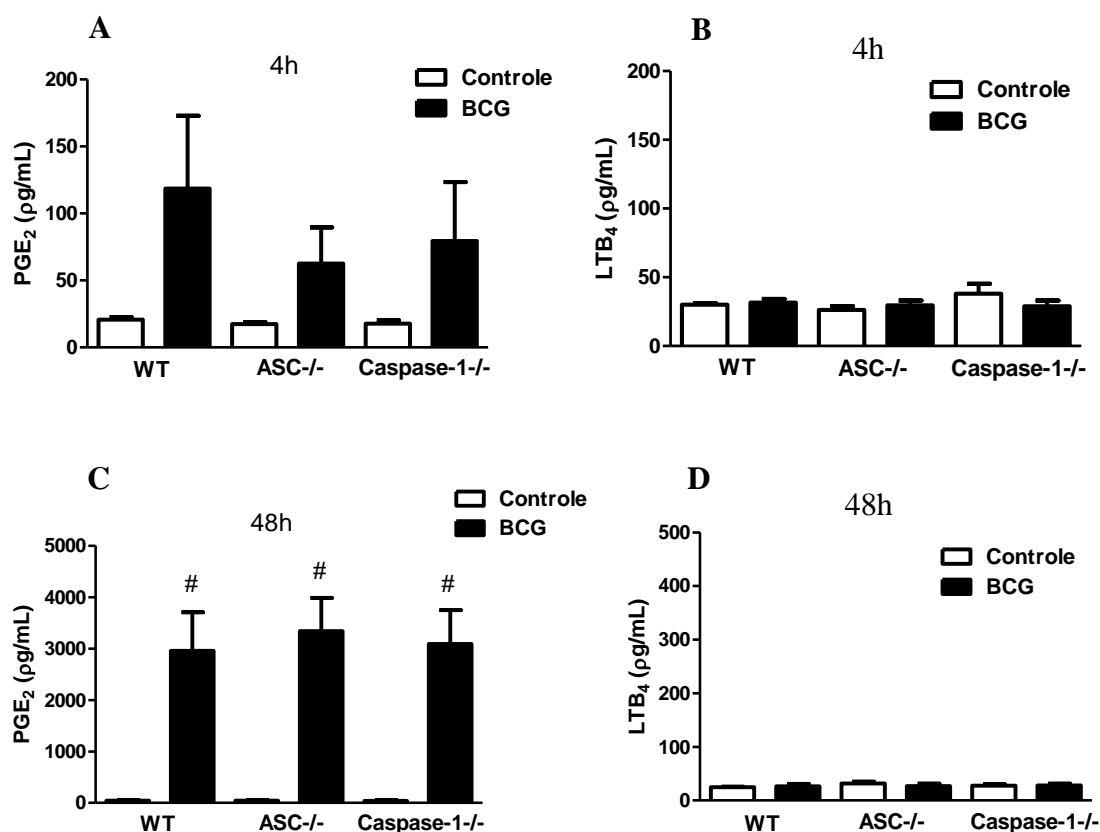


Figura 25: ASC e caspase-1 não modulam a produção de PGE₂ (A e C) e LTB₄ (B e D) em macrófagos infectados por BCG. Os sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou ASC^{-/-} e caspase-1^{-/-} infectados ou não com BCG por 4 horas (A e B) ou por 48 horas (C e D) foram avaliados por EIA. Gráficos representativos com as médias ± SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. #, p<0,001, quando macrófagos infectados de animais selvagens, ASC^{-/-} e caspase-1^{-/-} foram comparados com macrófagos destes mesmos grupos não infectados.

Metas: Analisar o envolvimento de NLRP3 na formação de CL e na liberação de eicosanóides induzida por BCG

4: A liberação de IL-1β induzida por BCG é reduzida após bloqueio de NLRP3

O receptor tipo Nod NLRP3 é o mais bem estudado quanto às suas formas de ativação, formação de inflamassomos e diversidade de agonistas. A participação do

inflamassomo NLRP3 na resposta à micobactérias já foi descrita, inclusive interagindo com outros receptores, como Nod2 (Marina-Garcia *et al.*, 2008).

A partir disso, buscamos investigar se NLRP3 teria alguma participação na biogênese de CL induzida por BCG. Pré-tratamos estas células com cloreto de potássio (KCl), por 15 minutos antes da infecção, impedindo a formação do inflamassomo NLRP3. A alta concentração extracelular de potássio impede o efluxo do mesmo, que é induzido por um estímulo danoso. O efluxo de potássio é uma das condições que levam à ativação do inflamassomo NLRP3, se o potássio não sair da célula, não ocorre ativação deste receptor e formação de inflamassomo. Outra estratégia foi a utilização do inibidor farmacológico gliburídeo, utilizado por 1 hora antes da infecção.

Vemos na figura abaixo que a indução da liberação de IL-1 β por BCG é reduzida significativamente após o tratamento com gliburídeo e KCl. Alguns fatores podem explicar a não redução total da secreção de IL-1 β após a utilização dos inibidores. Outros receptores podem ser ativados por BCG e levar à secreção desta citocina. Também a dose dos inibidores utilizados ou o tempo de inibição podem ter influenciado nesta secreção.

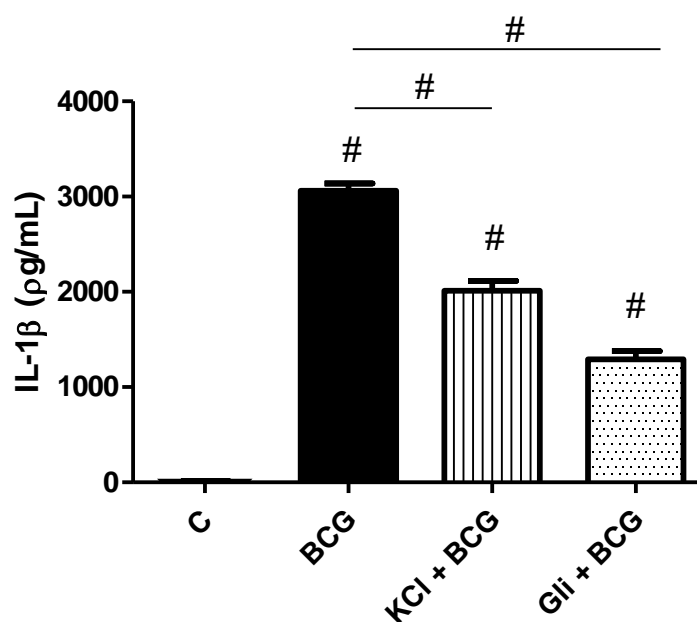


Figura 26: O bloqueio de NLRP3 reduz a liberação de IL-1 β induzida por BCG. Macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens foram infectados ou não (controle) com *M. bovis* BCG por 24 horas. Houve ainda um pré-tratamento de algumas células com KCl (150mM) ou gliburídeo (200 μ M). Os sobrenadantes das culturas celulares foram utilizados para avaliação da liberação de IL-1 β por ELISA. Gráfico representativo com as médias \pm SEM de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando células infectadas ou infectadas e tratadas foram comparadas com células não infectadas; também quando são comparadas células tratadas com KCl ou gliburídeo e infectadas com células infectadas e não tratadas com os inibidores.

4.1: O bloqueio do receptor NLRP3 leva ao aumento da formação de CL induzida por BCG

Podemos ver na figura 27 que BCG induz aumento do número de CL em relação à macrófagos não infectados e o bloqueio de NLRP3 com KCl leva ao aumento ainda maior da formação de CL após infecção com BCG. Podemos ver também que existe uma tendência à repetição do fenômeno observado com KCl em células tratadas com gliburídeo. Parece haver aumento do número de CL nessas células após infecção, mas este não foi significativo estatisticamente.

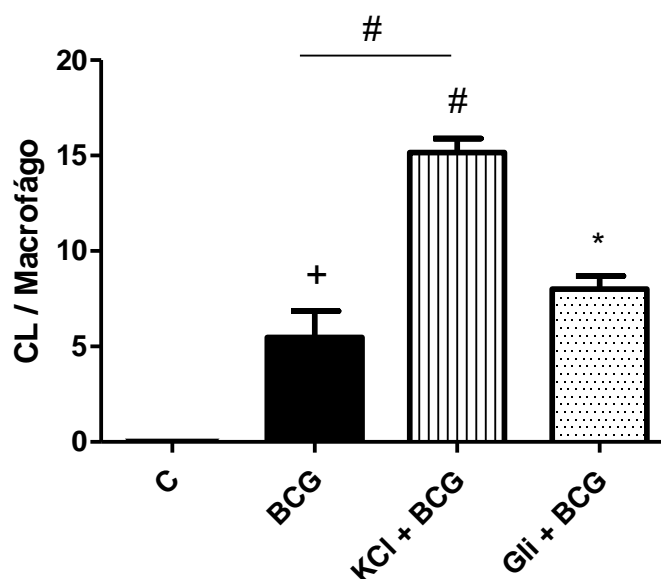


Figura 27: O bloqueio de NLRP3 potencializa a formação de CL induzida por BCG. Macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens foram infectados ou não (controle) com *M. bovis* BCG por 24 horas. Houve ainda um pré-tratamento de células com KCl por 15 minutos (150mM) ou gliburídeo por 1 hora (200µM). O número de corpúsculos lipídicos foi avaliado por contagem após coloração com tetróxido de ósmio. Gráfico representativo com as médias ± SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando são comparadas células tratadas com KCl e infectadas com células não infectadas ou com células infectadas. *, $p < 0,01$, quando células tratadas com gliburídeo e infectadas foram comparadas com células não infectadas. +, $p < 0,05$, quando células infectadas foram comparadas com células não infectadas.

4.2: A secreção de PGE₂ é diminuída pelo bloqueio de NLRP3

Como já vimos em resultados anteriores, a infecção de macrófagos derivados de medula óssea por BCG induz a liberação de PGE₂. O bloqueio do receptor NLRP3 com gliburídeo reduz significativamente a secreção deste prostanóide induzida por BCG (figura 28A). Houve uma tendência à diminuição da liberação de PGE₂ em células

tratadas com KCl e infectadas, outro inibidor de NLRP3, mas esta diminuição não foi estatisticamente significativa.

Quanto à secreção de LTB_4 , vimos que não há liberação de quantidades significativas deste eicosanóide nos sobrenadantes de células infectadas e tratadas e infectadas (figura 28B).

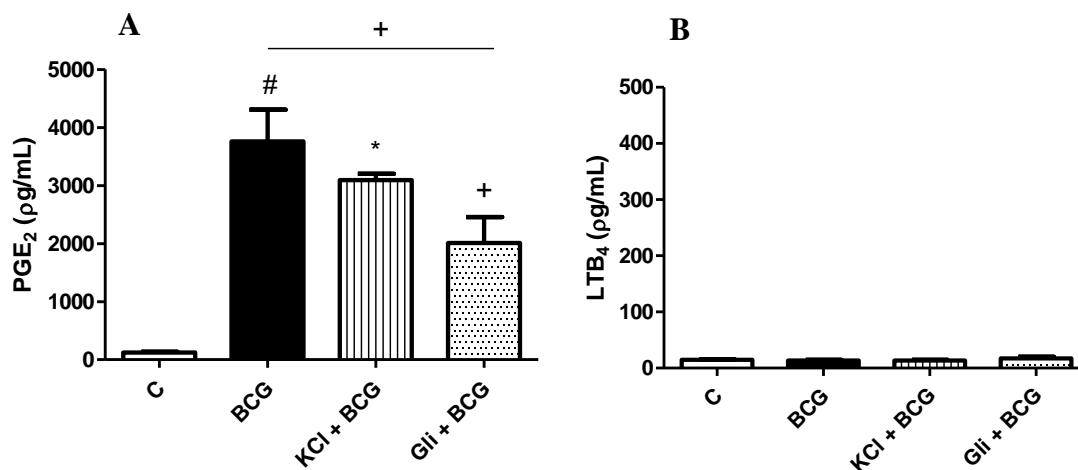


Figura 30: Efeito da inibição de NLRP3 na secreção de PGE_2 (A) e de LTB_4 (B). Os sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea tratados ou não com gliburídeo por 1 hora (200mM) ou KCl por 15 minutos (150mM) e infectados com BCG por 24 horas foram avaliados por EIA. Gráficos representativos com as médias \pm SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando macrófagos infectados foram comparados com macrófagos não infectados. *, $p < 0,01$, quando células tratadas com KCl e infectadas foram comparadas com células não infectadas. +, $p < 0,05$, quando células tratadas com gliburídeo e infectadas são comparadas com células não infectadas; também quando células infectadas e não tratadas são comparadas com células tratadas com gliburídeo e infectadas.

Metas: Ativar inflamassomo com LPS+ATP para pesquisar se e como essa ativação influencia na formação de corpúsculos lipídicos e a liberação eicosanóides

5: ATP induz biogênese de corpúsculos lipídicos

Além de formar o inflamassomo mais bem caracterizado e estudado, NLRP3 é um receptor que pode ser ativado por uma ampla gama de agonistas, tais como cristais de ácido úrico, diversos PAMPs e DAMPs, como ATP etc.

Iniciamos uma investigação, sobre a possibilidade de modulação da quantidade de CL em macrófagos quando estes são estimulados por agonistas de NLRP3, escolhemos um dos mais utilizados e estudados, o ATP.

Sabemos que o ATP sozinho é incapaz de ativar inflamassomos, como visto na figura 29A, onde a liberação de IL-1 β só acontece quando estimulamos as células com um primeiro sinal, no nosso caso, LPS, seguido pelo tratamento com ATP. O LPS induz a formação de pro-IL-1 β após ativação de NF- κ B e essa pro-IL-1 β é processada pelo inflamassomo reunido após estímulo com ATP. O tratamento isolado dos macrófagos com ATP ou LPS não induz a secreção de IL-1 β (figura 29A).

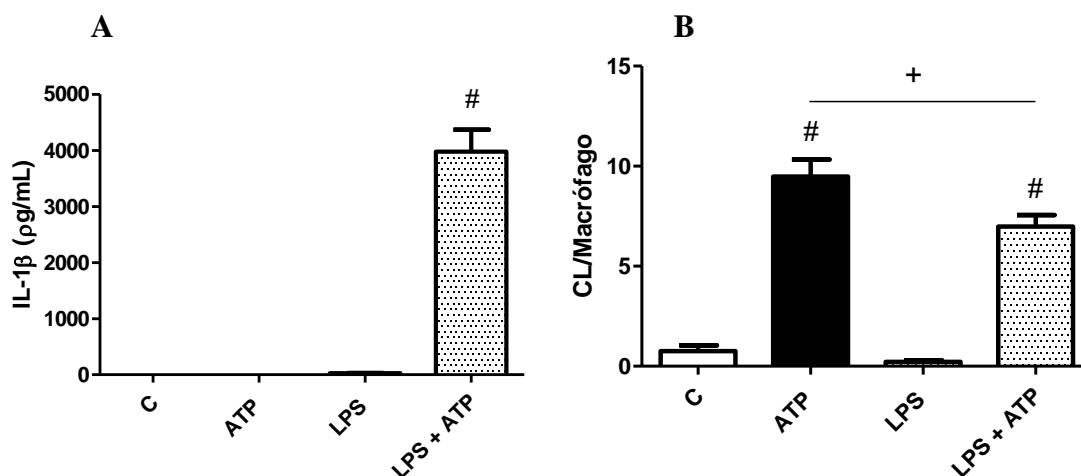


Figura 29: ATP induz biogênese de CL. Macrófagos derivados de medula óssea foram tratados com ATP (2mM) ou LPS (1 μ g/mL), por 24 horas ou incubados com LPS por 4 horas, seguido de tratamento com ATP por mais 20 horas. Os sobrenadantes das culturas foram analisados por ELISA para IL-1 β (A) e as células foram coradas com tetróxido de ósmio para contagem de corpúsculos lipídicos (B). Os dados representam as médias \pm SEM de resultados obtidos em 4 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando comparamos a quantidade de IL-1 β liberada por células tratadas com LPS + ATP e células não tratadas; também quando comparamos o número de CL entre células tratadas com ATP ou LPS + ATP com células não tratadas. +, $p < 0,05$, quando o número de CLs de células tratadas com ATP são comparadas com o número de CLs de células tratadas com LPS + ATP.

Observamos na figura 29B que ATP sozinho já é capaz de induzir um aumento significativo da biogênese de corpúsculos lipídicos. Em nosso modelo de estudo, LPS sozinho, no tempo utilizado, não induziu a geração de CL. O tratamento de macrófagos com LPS seguido do estímulo com ATP induziu um número de CL inferior ao observado em células tratadas somente com ATP.

5.1: A ativação de inflamassomos por LPS + ATP leva ao aumento da liberação de eicosanóides

Também testamos a influência de LPS, ATP ou LPS + ATP sobre a secreção dos eicosanóides PGE₂ e LTB₄ em macrófagos derivados de medula óssea.

Vemos que ATP sozinho não modula liberação de PGE₂, mas LPS e LPS + ATP liberam grandes e similares quantidades deste prostanóide (figura 30A). Isso sugere que a sinalização desencadeada por LPS é suficiente para aumentar produção de PGE₂, e a adição de ATP não altera essa produção.

Na figura 30B, vemos que a produção de LTB₄ é aumentada, ainda que em escala menor que PGE₂, após incubação dos macrófagos com LPS + ATP. O tratamento com LPS ou ATP isoladamente não modula a liberação de LTB₄.

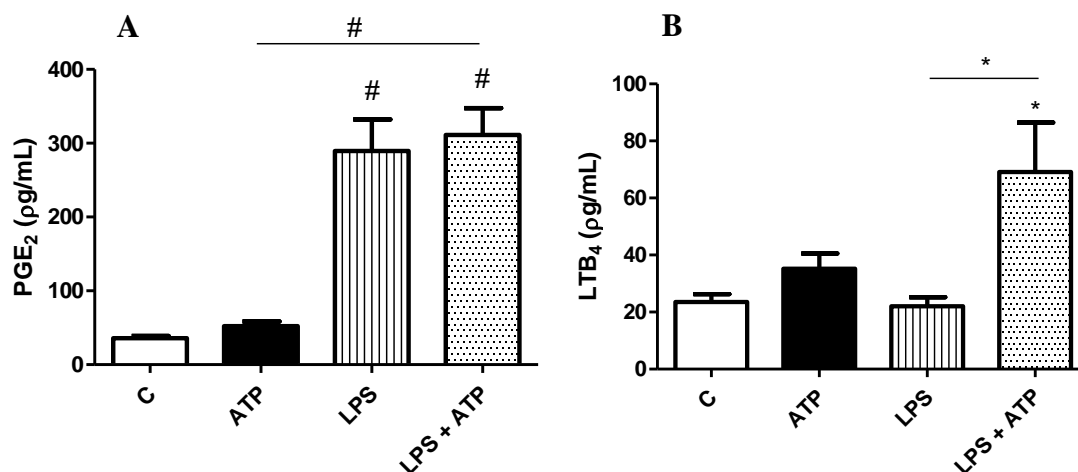


Figura 30: A ativação de inflamassomos por LPS e ATP leva ao aumento da liberação de eicosanóides. Os sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos, tratados com ATP (2mM), LPS (1µg/mL) ou LPS + ATP foram analisados por EIA para avaliação de PGE₂ (A) e LTB₄ (B). Os dados representam as médias ± SEM de resultados obtidos em 4 experimentos independentes. #, p<0,001, quando comparamos células tratadas com LPS + ATP ou somente LPS com células não tratadas; também quando comparamos células tratadas com ATP com células tratadas com LPS + ATP quanto à liberação de PGE₂. *, p<0,05, quando células tratadas com LPS+ATP são comparadas com células não tratadas ou tratadas com LPS, quanto à liberação de LTB₄.

6. A indução de corpúsculos lipídicos por ATP é dependente de P2X₇

O receptor P2X₇ pertence à uma família de receptores purinérgicos, P2X, de canais iônicos, que possui ainda outros 6 componentes (Burnstock, 2012). Ele é ativado por ATP extracelular e estimula o canal panexina a abrir, permitindo a saída de K⁺ da célula. Esse é um dos eventos que leva à ativação de NLRP3 e formação de inflamassomo e isso associa o receptor P2X₇ à resposta imune inata (Becker and O'Neil, 2007).

Seguindo o resultado anterior, da indução de CL por ATP, tivemos como próximo passo, a investigação da via pela qual esse fenômeno acontece. O candidato

mais provável foi o receptor purinérgico de ATP, P2X₇. Utilizamos o antagonista deste receptor, BBG, por 30 minutos antes de estimular as células com ATP.

Podemos ver na figura 31 que o aumento de CL induzido por ATP é revertido em presença de BBG, mostrando que o receptor P2X₇, ativado por ATP, leva ao aumento da biogênese de CLs.

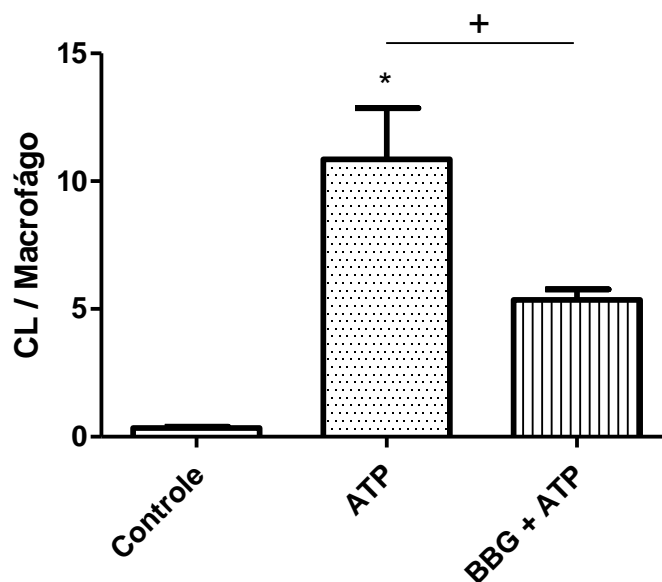


Figura 31: P2X₇ é importante para a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por ATP. Macrófagos derivados de medula óssea foram tratados com ATP (2mM) ou tiveram seus receptores P2X₇ inibidos com BBG (100 μ M) 30 minutos antes do estímulo com ATP. Corpúsculos lipídicos foram contados por microscopia ótica, após coloração com tetróxido de ósmio. Gráfico representativo com as médias \pm SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. *, $p < 0,01$, quando células tratadas com ATP foram comparadas com células não tratadas. +, $p < 0,05$, quando células tratadas com ATP são comparadas com células tratadas com BBG + ATP.

Metas: Inibir o receptor P2X₇ e ver se isso afeta a biogênese de CL e a liberação de IL-1 β induzida por BCG

7. O bloqueio do receptor P2X₇ favorece o aumento do número de corpúsculos lipídicos induzido por BCG

Em função da interação das vias de ativação de NLRP3 e de P2X₇, estudamos se esse receptor purinérgico teria alguma contribuição para a formação de CL induzida por BCG. Para isso, utilizamos novamente o inibidor de P2X₇, o BBG. Os macrófagos derivados de medula foram tratados com BBG por 30 minutos antes da infecção e então infectados ou não com BCG.

Podemos ver na figura 32A que *M. bovis* BCG induz aumento significativo do número de CL, e a inibição de P2X₇, com BBG, leva a um aumento ainda maior no número destas organelas. Na figura 32B vemos que a secreção de IL-1 β é similar em células infectadas e não tratadas e infectadas e tratadas com BBG. Se o bloqueio de P2X₇ favorece a biogênese de CL, sua presença em células não bloqueadas e infectadas poderia estar regulando negativamente a formação destas organelas.

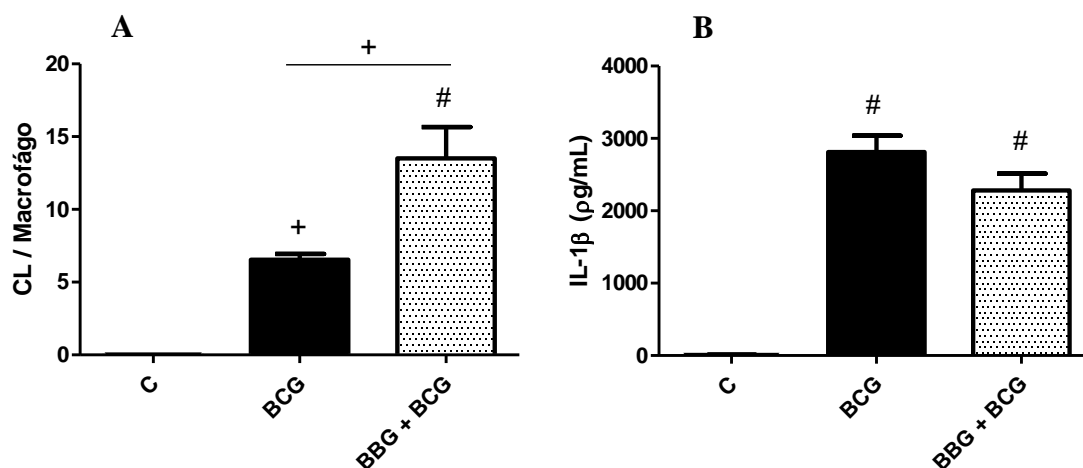


Figura 32: P2X₇ participa da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BCG, sem alterar a secreção de IL-1 β . Macrófagos derivados de medula óssea foram tratados ou não com o antagonista de P2X₇, BBG (100 η M) por 30 minutos antes da infecção e então infectados ou não com BCG, por 24 horas. As células foram coradas por ósmio para contagem de CL (A) e os sobrenadantes foram analisados por ELISA para IL-1 β (B). Os dados representam as médias \pm SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. +, $p < 0,05$, quando células infectadas e não tratadas são comparadas com células não infectadas; também quando são comparadas células infectadas tratadas e não tratadas com o inibidor. #, $p < 0,001$, quando células tratadas com BBG e infectadas são comparadas com células não infectadas, quanto ao número de CL; também quando comparamos as quantidades de IL-1 β entre células infectadas ou infectadas e tratadas com células não tratadas e não infectadas.

Metas: Quantificar, após a infecção por BCG, os CL em macrófagos selvagens e deficientes em IL-1R1 e IL-18R infectados ou não por BCG

8. A formação de CL não é influenciada por IL-1R1 e IL-18R

As citocinas IL-1 β e IL-18 são liberadas das células e podem atuar de maneira autócrina ou parácrina. Suas ações se iniciam pela ligação à seus receptores específicos e após essa ligação ocorre cascata de transdução de sinais intracelulares que levam à transcrição de genes e outros eventos importantes na resposta inflamatória. Sendo assim, fomos avaliar se existe influência do receptor tipo 1 de IL-1 β e do receptor de IL-

18 na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com BCG por 4 e 48 horas.

Podemos ver nas figuras 33A e B, que o número de corpúsculos não é alterado na ausência de IL-1R1 ou de IL-18R, quando comparamos células infectadas dos grupos *knockout* e células selvagens, após 4 (A) ou 48 (B) horas de infecção.

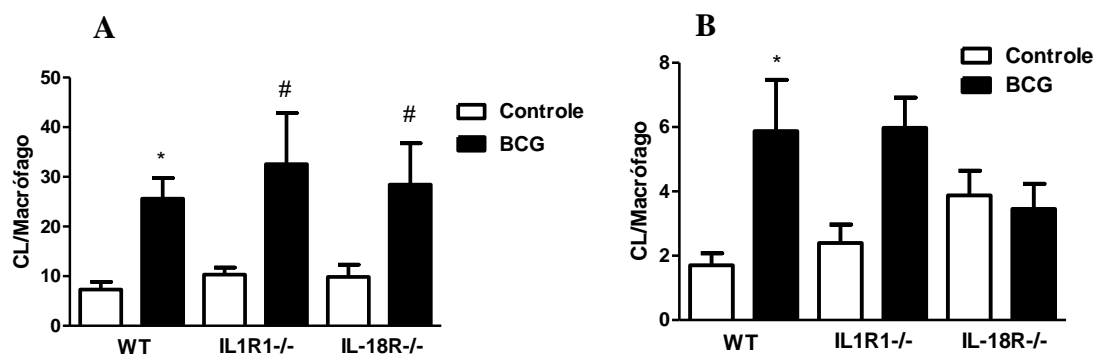


Figura 33: A formação de corpúsculos lipídicos não depende da participação dos receptores de IL-1 e de IL-18. Macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou IL-1R1^{-/-} e IL-18R^{-/-} foram infectados ou não com BCG por 4 horas (A) ou por 48 horas (B). O número de corpúsculos lipídicos foi avaliado por contagem em microscópio óptico após coloração com tetróxido de ósmio. Os dados representam as médias \pm SEM de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. *, $p < 0,01$, quando células WT infectadas por 4 ou 48 horas são comparadas com células não infectadas. #, $p < 0,001$, quando células infectadas por 4 horas dos grupos IL-1R1^{-/-} e IL-18R^{-/-} são comparadas com células não infectadas destes mesmos grupos.

8.1: A ativação de inflamassomos não é influenciada pela ausência dos receptores de IL-1 e de IL-18

A liberação de IL-1 β é estimulada pela infecção de macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens com BCG, após 4 e 48 horas de infecção. Essa liberação não é alterada pela ausência dos receptores de IL-1 e de IL-18 (figura 34A e B) nos tempos de infecção estudados.

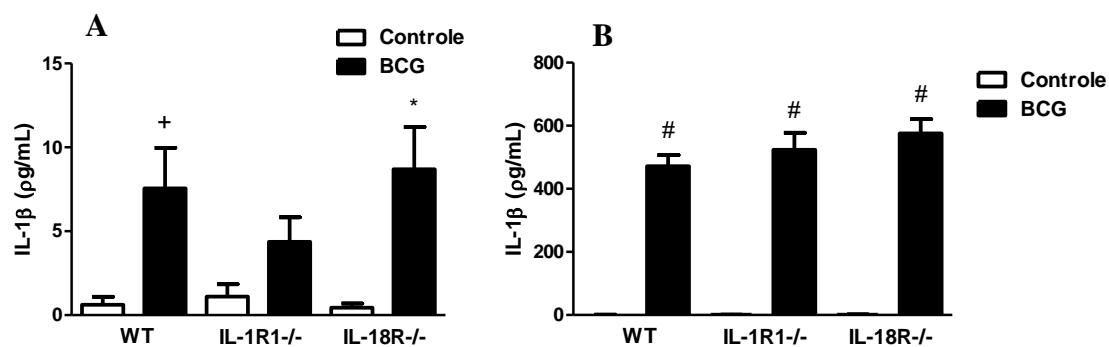


Figura 34: A liberação de IL-1 β é independente de IL-1R1 e IL-18R. Macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou IL-1R1^{-/-} e IL-18R^{-/-} foram infectados ou não (controle) com BCG por 4 horas (A) ou 48 horas (B). Os sobrenadantes das culturas celulares foram utilizados para avaliação da liberação de IL-1 β por ELISA. Os dados representam as médias \pm SEM de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. +, p<0,05, quando células WT infectadas por 4 horas são comparadas com células WT não infectadas. *, p<0,01, quando células IL-18R^{-/-} infectadas por 4 horas são comparadas com células não infectadas. #, p<0,0001, quando células infectadas por 48 horas dos três grupos são comparadas com células não infectadas destes mesmos grupos.

8.2: A liberação de PGE₂ não é alterada com a ausência de IL-1R1 e IL-18R

Continuamos interessados em avaliar a participação de moléculas relacionadas à imunidade inata na liberação de mediadores lipídicos. A secreção de PGE₂ é similar entre macrófagos infectados de animais selvagens e deficientes de IL-1R1 e IL-18R, após infecção com BCG por 4 ou 48 horas (figura 35A e B).

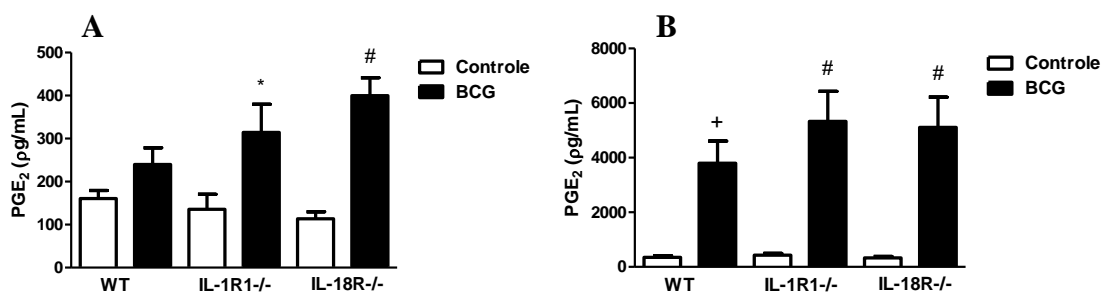


Figura 35: A produção de PGE₂ induzida por BCG é independente de IL-1R1 e IL-18R. Os sobrenadantes de macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (WT) ou IL1R1^{-/-} e IL-18R^{-/-} infectados ou não com BCG por 4 horas (A) ou 48 horas (B) foram avaliados por EIA. Os dados representam as médias \pm SEM de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. +, p<0,05, quando células WT infectadas por 48 horas são comparadas com células não infectadas. *, p<0,01, quando células IL1R1^{-/-} infectadas por 4 horas são comparadas com células IL1R1^{-/-} não infectadas. #, p<0,001, quando células IL18R^{-/-} infectadas por 4 horas são comparadas com células não infectadas; também quando são comparadas células IL1R1^{-/-} e IL-18R^{-/-} infectadas por 48 horas com células não infectadas do mesmo grupo.

Com estes resultados concluímos que os receptores tipo 1 de IL-1 β e de IL-18 não modulam a formação de corpúsculos lipídicos, a ativação de inflamassomos e a liberação de PGE₂. Além disso, podemos inferir que as citocinas IL-1 β e IL-18 também não modulam estes fenômenos. Isso porque, com a ausência dos receptores nos macrófagos, estas citocinas que são liberadas pelos próprios macrófagos devido à infecção não atuam de maneira autócrina.

PARTE 2: Avaliar o papel dos corpúsculos lipídicos como sítio de compartimentalização de proteínas do complexo inflamassomo e o seu impacto na ativação dos inflamassomos e liberação de mediadores inflamatórios

Metas: Avaliar a cinética de ativação de inflamassomos em diferentes tempos de infecção *in vivo* com *M. bovis* BCG

9. Ativação de inflamassomos *in vivo*

Nosso laboratório demonstrou, em 2006, a habilidade de *Mycobacterium bovis* BCG em induzir formação de corpúsculos lipídicos em modelo de pleurisia, a partir de 1 hora de infecção e essa indução se mantém até mesmo 15 dias após a infecção (D'Ávila *et al.*, 2006). Resultados similares foram observados em macrófagos peritoneais, com aumentos crescentes e significativos no número de CL após 4 horas de infecção até 24 horas (Almeida *et al.*, 2009).

Ainda não havia sido mostrada a cinética de ativação de inflamassomo durante infecções *in vivo* por *Mycobacterium bovis* BCG. Fizemos então esta cinética, utilizando camundongos C57BL/6 infectados intraperitonealmente, por 1, 6, 24 e 48 horas, com 5×10^6 UFC de *M. bovis* BCG. Outros animais foram inoculados com salina estéril, como controles. Podemos ver na figura 36 que camundongos infectados por 1 hora já tem liberação significativa de IL-1 β em seus lavados peritoneais. Essa liberação alcança um pico após 6 horas de infecção e então diminui em 24 e 48 horas, mas ainda assim com grandes de quantidades IL-1 β liberadas e estas superiores às observadas nas cavidades dos animais inoculados com salina (0 horas).

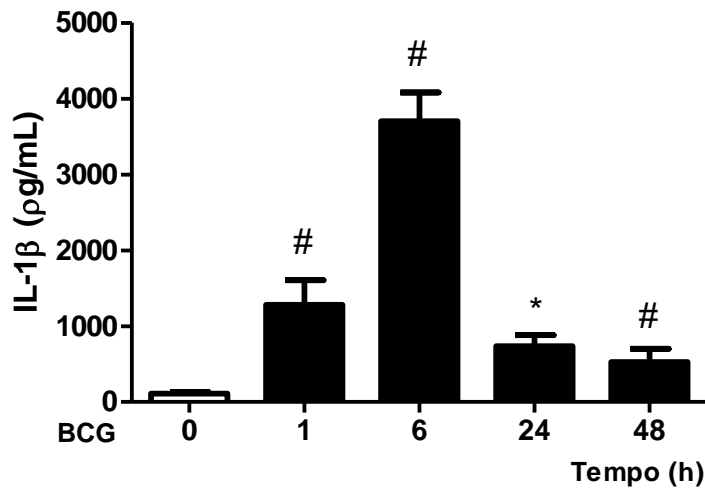


Figura 36: Níveis de IL-1 β liberados em lavados peritoneais de animais infectados ou não com *M. bovis* BCG após 1, 6, 24 e 48 horas, dosados por ELISA. Os dados representam as médias \pm SEM dos resultados obtidos em 2 experimentos realizados em triplicata. *, $p < 0,01$, quando lavados peritoneais de animais infectados por 24 hora foram comparados com lavados de animais inoculados com salina (0 horas) #, $p < 0,001$, quando lavados peritoneais de animais infectados por 1, 6 e 48 horas foram comparados com lavados de animais não infectados (0 horas).

Metas: Analisar presença ou translocação de NLRs e proteínas envolvidas em corpúsculos lipídicos durante a infecção

10. Compartimentalização de proteínas em corpúsculos lipídicos

Em alguns anos de estudo de corpúsculos lipídicos, foi vista a presença, em alguns casos, de moléculas envolvidas na resposta inflamatória, tais como citocinas, enzimas, mediadores lipídicos, no interior destas organelas (revisado por Bozza *et al.*, 2009). Mas até o momento nada foi visto sobre proteínas envolvidas na via dos inflamassomos interagindo com os corpúsculos.

Portanto, resolvemos investigar a possível presença em corpúsculos lipídicos de proteínas como os receptores Nod1, Nod2 e sua proteína adaptadora Rip2; do receptor NLRP3, da proteína adaptadora ASC, da enzima caspase-1 e da citocina IL-1 β .

Para isso, utilizamos o modelo *in vivo*, com camundongos C57BL/6 sendo infectados intraperitonealmente, por 48 horas, com 5×10^6 UFC de *Mycobacterium bovis* BCG. Outros animais foram inoculados com salina estéril para utilizarmos como controles. As células peritoneais, constituídas por mais de 90% de macrófagos, foram recolhidas e analisadas por microscopia confocal após marcação com anticorpos específicos contra as proteínas de interesse.

Além das análises de imagens, avaliamos, quando possível, a presença das proteínas de interesse através de uma técnica de fracionamento subcelular. Com os lisados celulares de macrófagos derivados de medula óssea infectados por 24 horas com BCG, fizemos gradientes de sacarose, seguido de ultracentrifugação, que resulta nas frações celulares descritas no item metodologia. Através de western blot das frações, confirmamos a presença de corpúsculos lipídicos nas frações 1 e 2 dos gradientes, através da marcação com anticorpo ADRP (proteína estrutural dos CLs). A partir daí realizamos marcações para as proteínas de interesse, visando estudar sua presença ou não nas frações ricas em corpúsculos lipídicos (frações 1 e 2).

10.1: NLRP3

Está bem estabelecido que ocorre cooperação entre receptores de imunidade inata para geração de respostas eficazes contra patógenos, seus PAMPs, ou ainda contra DAMPs. Essa cooperação pode ocorrer entre TLRs e NLRs, mas também entre os receptores tipo Nod intracelulares (Marina-Garcia *et al.*, 2008). Nesse sentido, já foi descrita a cooperação entre NLRP3 e Nod2 para o combate à infecções micobacterianas. Sendo assim, pesquisamos se este receptor poderia estar presente nos corpúsculos lipídicos.

Vemos na figura 37 que existe presença de NLRP3 em corpúsculos lipídicos de macrófagos de animais infectados, mas não em macrófagos de animais não infectados, onde a expressão deste receptor é praticamente inexistente.

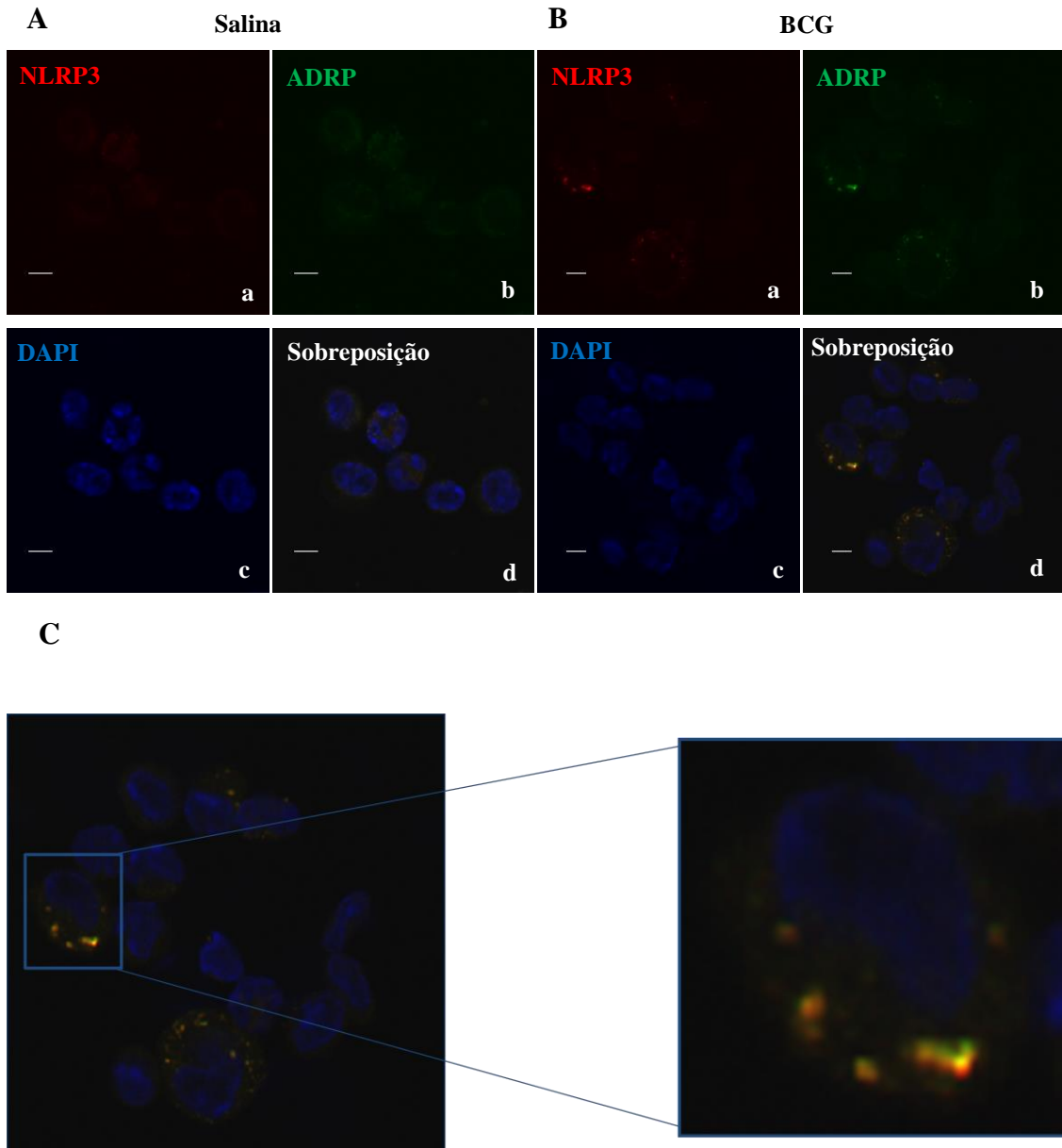


Figura 37: Localização celular de NLRP3 após ativação com BCG. Imagens obtidas com microscópio confocal, ilustrando a expressão de NLRP3 (vermelho) e corpúsculos lipídicos (verde) em macrófagos peritoneais após 48 horas de inoculação com salina (A) ou BCG (B). Em azul vemos os núcleos das células, com DAPI. Em a, vemos a marcação para NLRP3, em b, marcação de ADRP para corpúsculos lipídicos, em c vemos os núcleos e em d temos a sobreposição das imagens, que possibilita ver ou não a co-localização da proteína estudada e dos corpúsculos lipídicos. Em C, temos uma imagem ampliada da co-localização. Barras = 5µm.

10.2: ASC

Analisando as imagens geradas por microscopia confocal, podemos ver que ASC não co-localiza nos corpúsculos lipídicos (Figura 38). De maneira interessante, vemos que nas células de animais não infectados ASC encontra-se disperso pelo citoplasma,

mas em macrófagos peritoneais de animais infectados parece haver uma deslocamento de ASC do citoplasma para o núcleo das células (Figura 38A e B).

Na figura 38C, podemos observar na marcação de ASC que, de fato, este não se localiza nos corpúsculos lipídicos, uma vez que não vemos bandas nas frações lipídicas, que são F1 e F2. A proteína ASC está presente nas frações de 4 a 7.

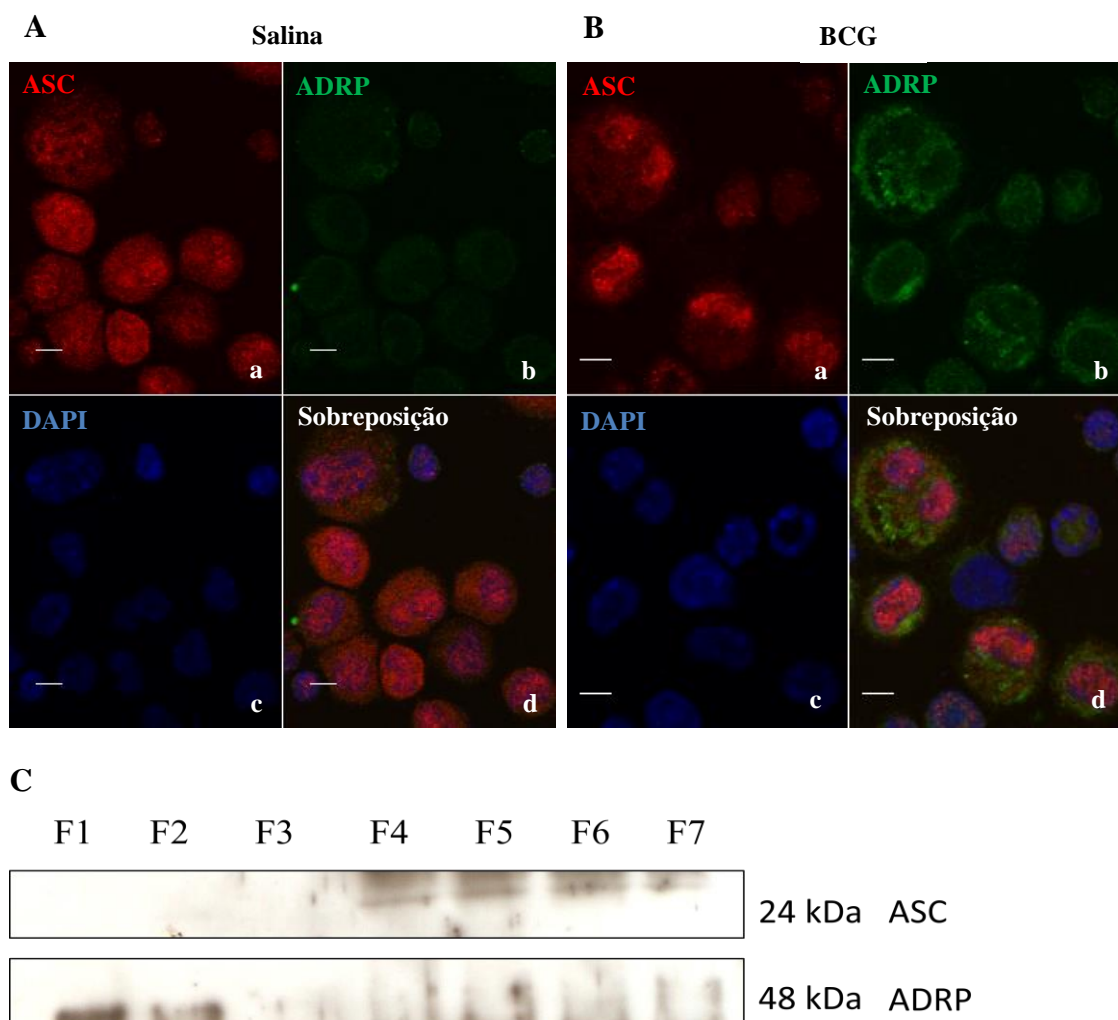
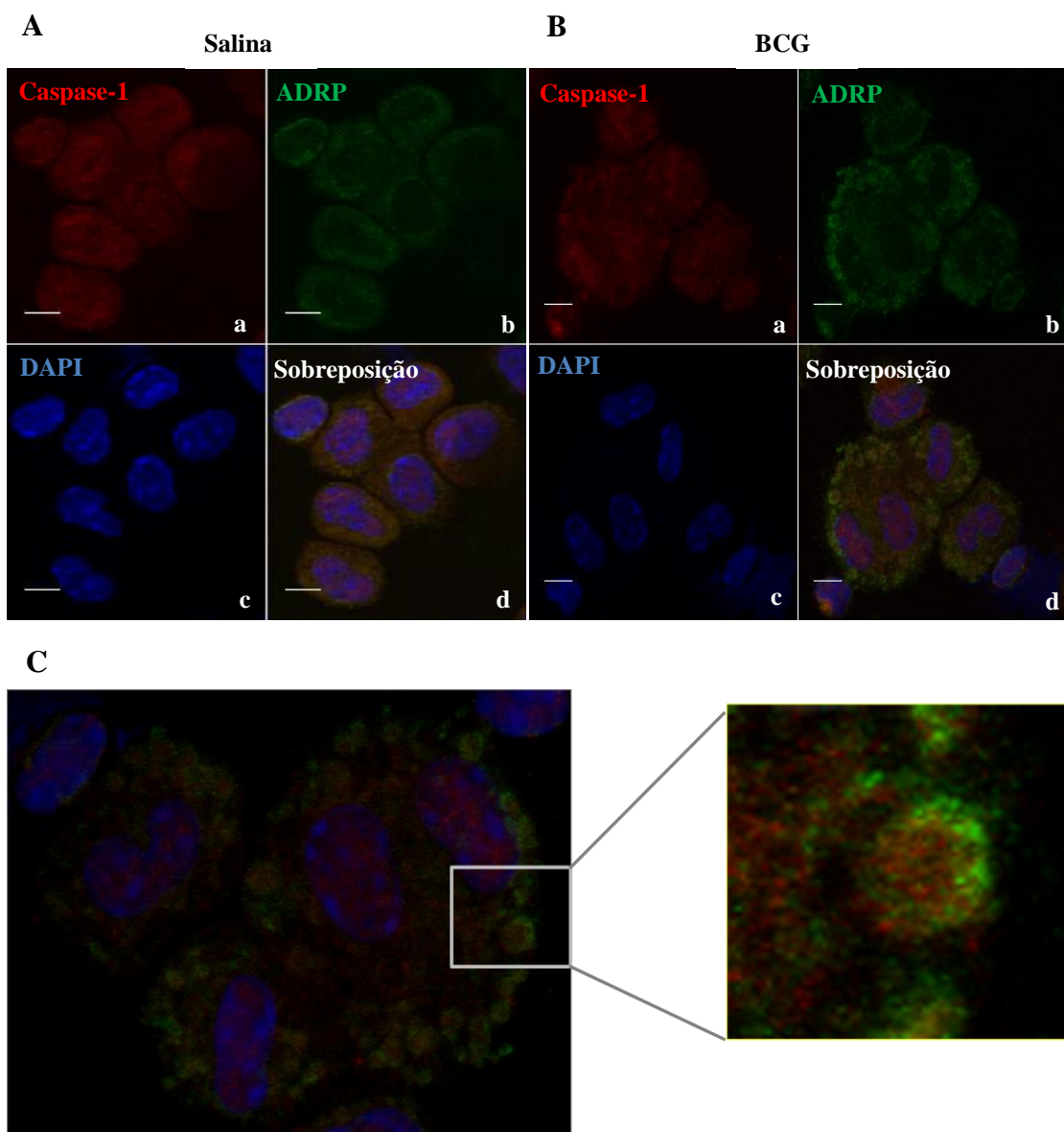


Figura 38: Localização celular de ASC após ativação com BCG. A e B: Imagens obtidas com microscópio confocal, ilustrando a expressão de ASC (vermelho) e corpúsculos lipídicos (verde) em macrófagos peritoneais após 48 horas de inoculação com salina (A) ou BCG (B). Em azul vemos os núcleos das células, com DAPI. Em a vemos a marcação para ASC (24kDa), em b, marcação de ADRP para corpúsculos lipídicos (anéis verdes), em c vemos os núcleos e em d temos a sobreposição das imagens, que possibilita ver ou não a co-localização da proteína estudada e dos corpúsculos lipídicos. Em C, temos as bandas obtidas após western blot das frações do gradiente de sacarose. F=fração. Barras = 5µm.

10.3: Caspase-1

Em seguida, pesquisamos se a enzima caspase-1, um dos componentes do inflamassomo, estaria associada aos corpúsculos. Como vemos na figura 39 (B e C), caspase-1 encontra-se nos corpúsculos lipídicos de macrófagos peritoneais infectados por BCG, mas não em células não infectadas (figura 39A). Este resultado foi confirmado através de western blot das frações do gradiente de sacarose (figura 39C). Nesta figura, vemos que a forma não clivada de caspase-1, de 45kDa, encontra-se nos corpúsculos lipídicos (fração 2). Ambas as formas, não clivada e clivada (10kDa) encontram-se nas frações 4 a 7.



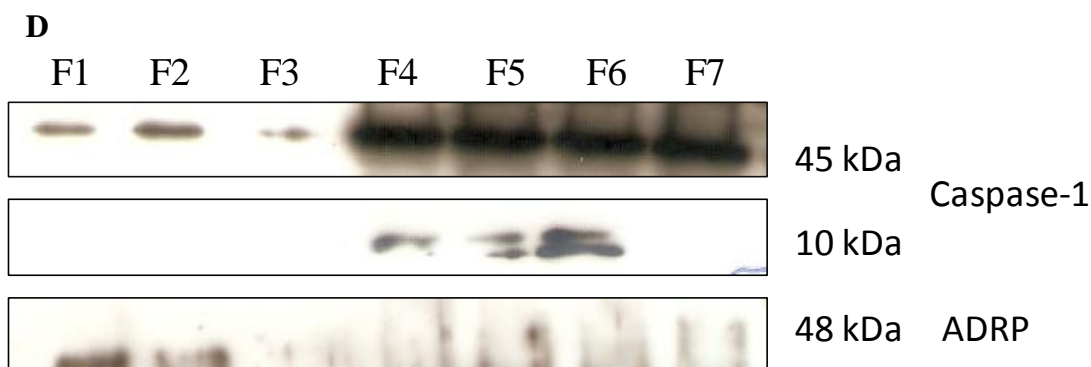


Figura 39: Localização celular de caspase-1 após ativação com BCG. A e B: Imagens obtidas com microscópio confocal, ilustrando a expressão de caspase-1 (vermelho) e corpúsculos lipídicos (verde) em macrófagos peritoneais após 48 horas de inoculação com salina (A) ou BCG (B). Em azul vemos os núcleos das células, com DAPI. Em a vemos a marcação para caspase-1 (vermelho), em b, marcação de ADRP para corpúsculos lipídicos (anéis verdes), em c vemos os núcleos e em d temos a sobreposição das imagens, que possibilita ver ou não a co-localização da proteína estudada e dos corpúsculos lipídicos. Em C, temos uma imagem ampliada da co-localização. Em D, bandas obtidas após western blot das frações do gradiente de sacarose. F=fração. Barras = 5 μ m.

10.4: IL-1 β

O próximo passo foi analisar a localização, em macrófagos, da citocina pro-inflamatória IL-1 β , que tem sua pro-forma clivada por caspase-1, para geração da citocina madura, pronta para ser liberada para o meio extracelular.

Vemos que células não infectadas praticamente não mostram marcação para esta citocina (figura 40A), mas células infectadas com BCG mostram expressão da mesma e também vemos sua presença no interior dos corpúsculos lipídicos (figura 40B).

Curiosamente, não vimos a presença de IL-1 β nas frações lipídicas obtidas com o gradiente de sacarose (figura 40C). Mas vemos a presença das formas não clivada (31kDa) e da forma clivada (17kDa) nas frações 4 a 7.

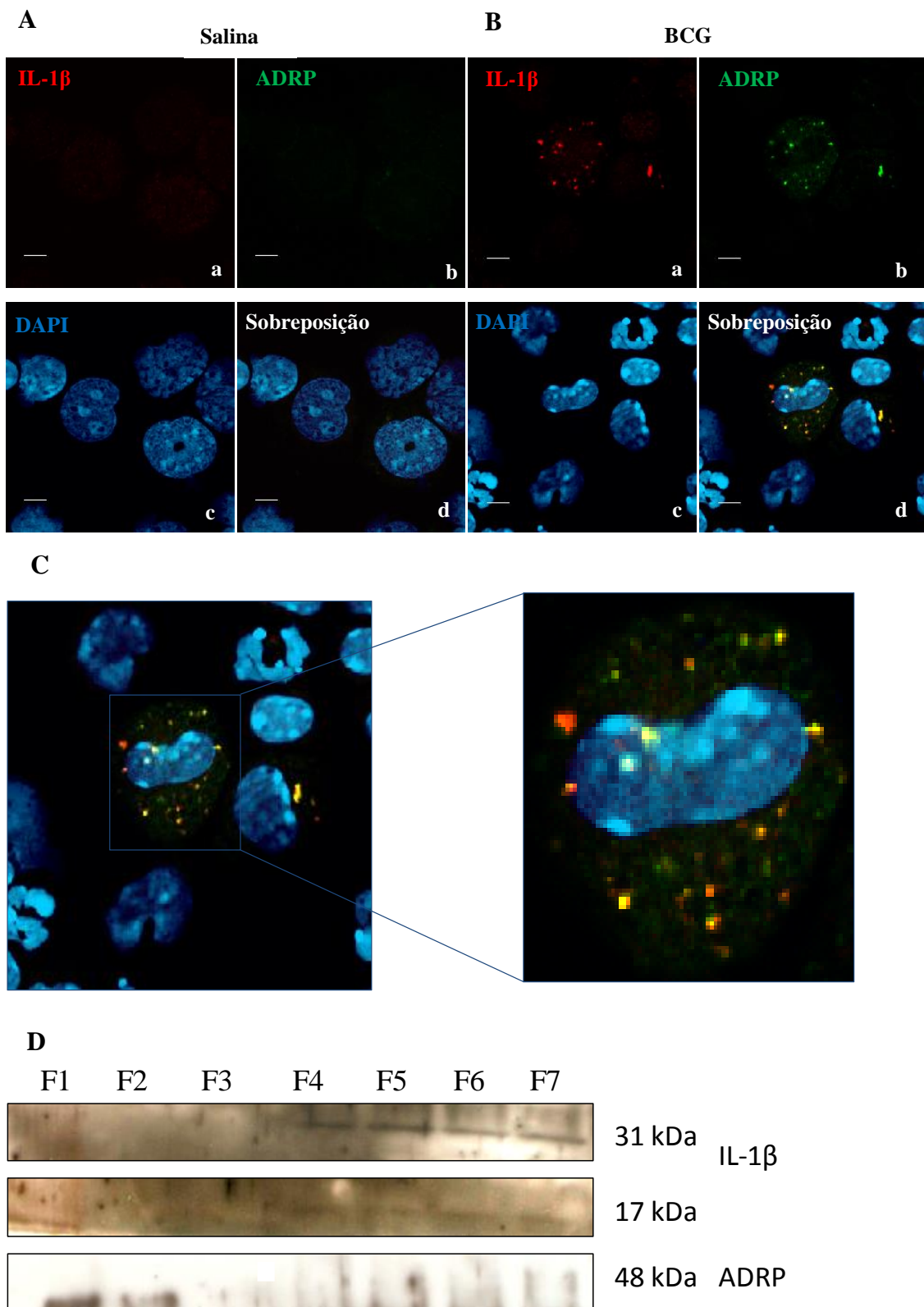


Figura 40: Localização celular de IL-1 β após ativação com BCG. A e B: Imagens obtidas com microscópio confocal, ilustrando a expressão de IL-1 β (vermelho) e corpúsculos lipídicos (verde) em macrófagos peritoneais após 48 horas de inoculação com salina (A) ou BCG (B). Em a vemos a marcação para IL-1 β , em b, marcação de ADRP para corpúsculos lipídicos (anéis verdes), em c vemos os núcleos, corados com DAPI e em d temos a sobreposição das imagens, que possibilita ver ou não a co-localização da proteína estudada e dos corpúsculos lipídicos. Em C, temos uma imagem ampliada da co-localização. Em D, bandas obtidas após western blot das frações do gradiente de sacarose. F=fração. Barras = 5 μ m.

10.5: Nod1

Após a pesquisa sobre os componentes de inflamassomos clássicos nos corpúsculos lipídicos, buscamos saber sobre a participação de receptores Nod como envolvidos na resposta à micobactérias e sua localização no interior de células infectadas e não infectadas.

Vemos na figura 41, que a expressão de Nod1 parece ser maior em células de animais infectados que em células de animais não infectados (figura 41A.a e B.a). Além disso, vemos também que em macrófagos de animais infectados temos mais corpúsculos lipídicos e vemos Nod1 associado à estas organelas lipídicas (figura 41B.d).

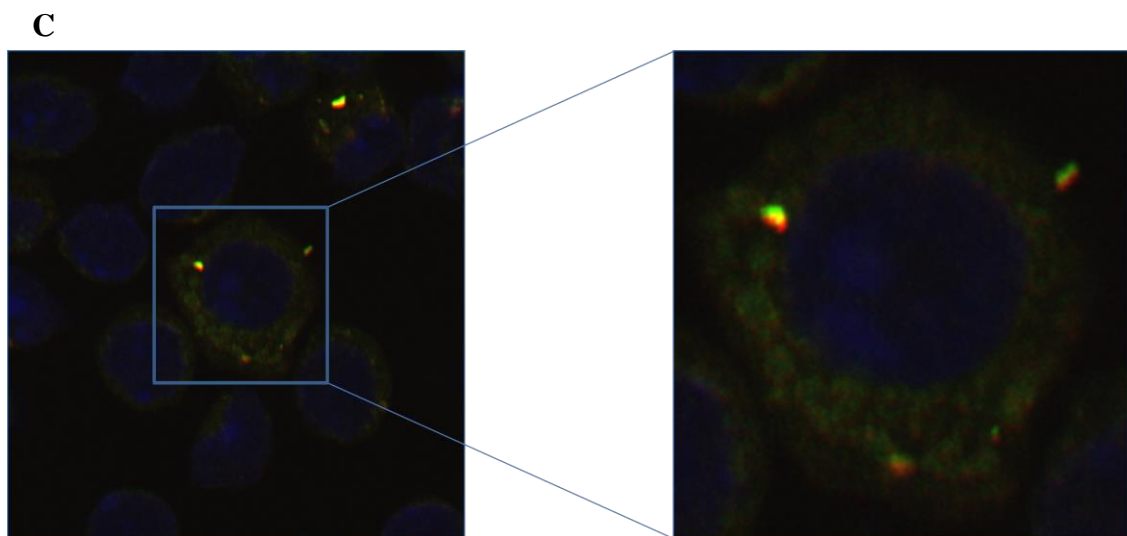
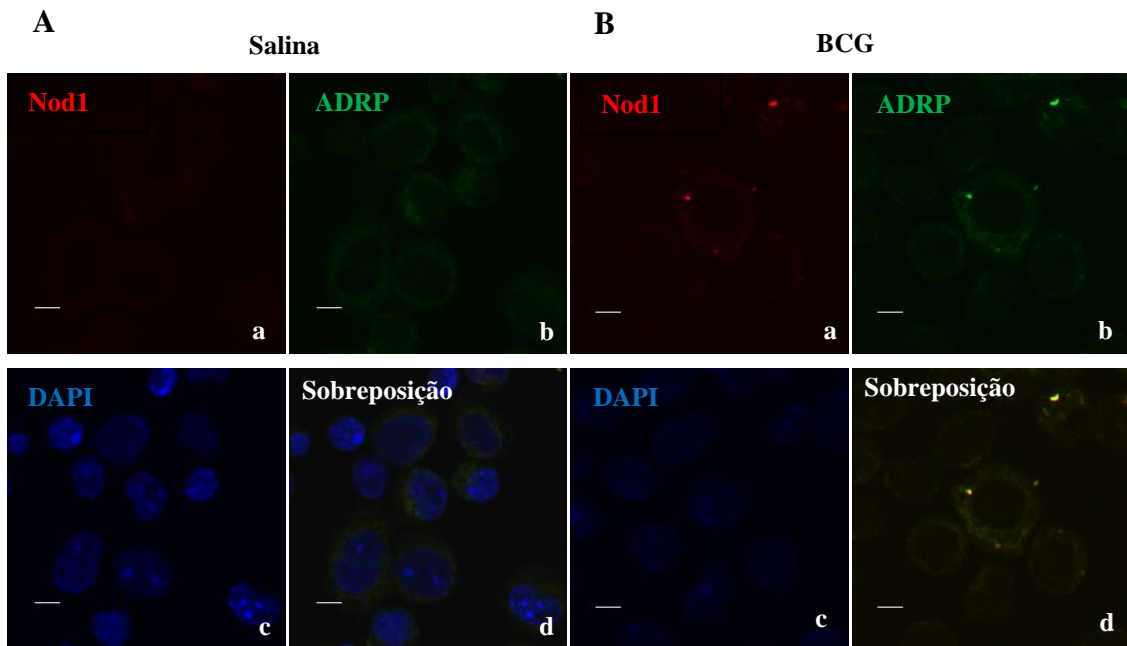


Figura 41: Localização celular de Nod1 após ativação com BCG. Imagens obtidas com microscópio confocal, ilustrando a expressão de Nod1 (vermelho) e corpúsculos lipídicos (verde) em macrófagos peritoneais após 48 horas de inoculação com salina (A) ou BCG (B). Em a vemos a marcação para Nod1, em b, marcação de ADRP para corpúsculos lipídicos (anéis verdes), em c vemos os núcleos, corados com DAPI e em d temos a sobreposição das imagens, que possibilita ver ou não a co-localização da proteína estudada e dos corpúsculos lipídicos. Em C, temos a imagem da co-localização ampliada. Barras = 5 μ m.

10.6: Nod2

A localização do receptor Nod2 também foi avaliada por microscopia. Um trabalho de 2011 (Brooks *et al.*) mostrou a presença da proteína Nod2 em macrófagos

derivados de monócitos, com um padrão pontual, e os autores sugerem que isso pode ser devido à presença deste receptor em organelas ou complexos presentes no citoplasma.

Nas imagens mostradas na figura 42A percebemos uma baixa expressão deste receptor em células de animais não infectados e um aumento da presença desta molécula em macrófagos de animais infectados por BCG (figura 42B). Além disso, vemos que uma parte dos receptores encontram-se associados aos corpúsculos lipídicos.

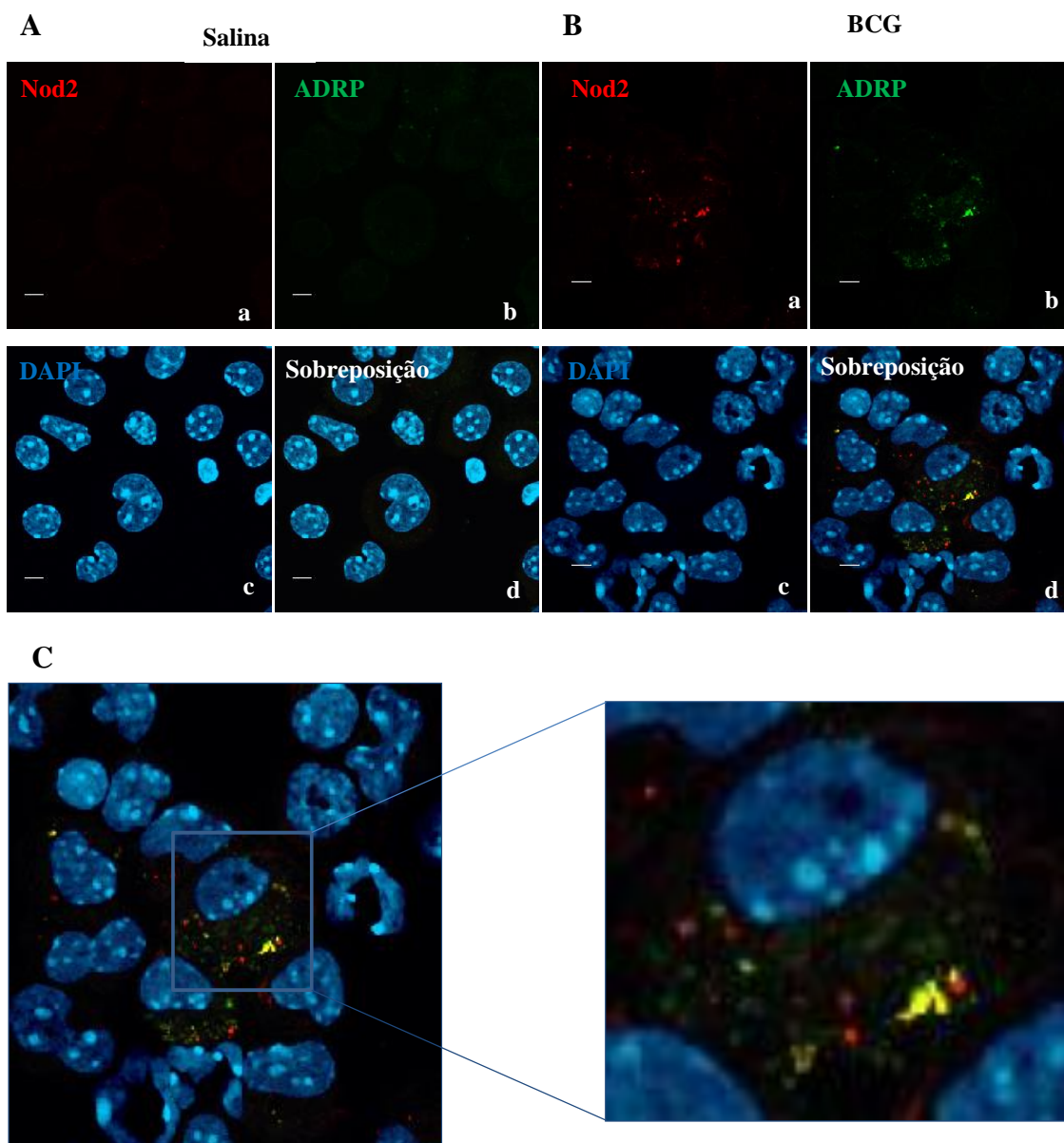


Figura 42: Localização celular de Nod2 após ativação com BCG. Imagens obtidas com microscópio confocal, ilustrando a expressão de Nod2 (vermelho) e corpúsculos lipídicos (verde) em macrófagos peritoneais após 48 horas de inoculação com salina (A) ou BCG (B). Em azul vemos os núcleos das células, com DAPI. Em a vemos a marcação para Nod2, em b, marcação de ADRP para corpúsculos lipídicos (anéis verdes), em c vemos os núcleos e em d temos a sobreposição das imagens. Em C, temos a imagem da co-localização ampliada. Barras = 5µm.

10.7: Rip2

Rip2 é uma proteína adaptadora dos receptores Nod1 e Nod2. Em associação à estes receptores não ocorre formação de inflamassomo clássico, mas sim a indução de uma via de sinalização intracelular que culmina com a ativação de NF- κ B e a transcrição de genes inflamatórios. Sendo assim, também buscamos avaliar se esta importante proteína da via dos receptores Nod estaria também presente nos corpúsculos lipídicos. Vemos na figura 43 que Rip2 também encontra-se presente em corpúsculos lipídicos de macrófagos de animais infectados com *M. bovis* BCG.

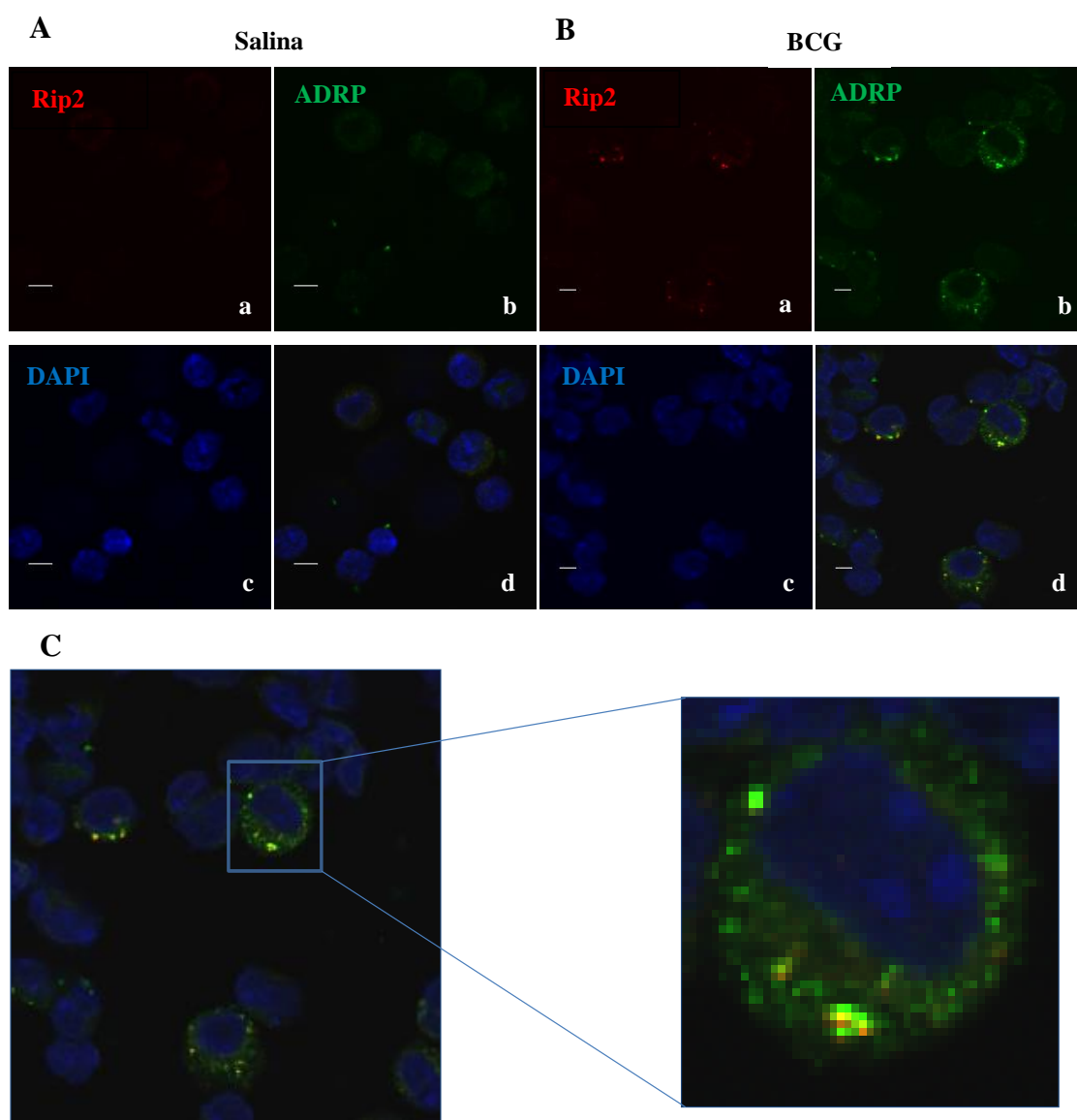


Figura 43: Localização celular de Rip2 após ativação com BCG. Imagens obtidas com microscópio confocal, ilustrando a expressão de Rip2 (vermelho) e corpúsculos lipídicos (verde) em macrófagos peritoneais após 48 horas de inoculação com salina (A) ou BCG (B). Em azul vemos os núcleos das células, com DAPI. Em a, vemos a marcação para Rip2, em b, marcação de ADRP para corpúsculos lipídicos, em c vemos os núcleos e em d temos a sobreposição das imagens. Em C, temos a imagem da co-localização ampliada. Barras = 5 μ m.

Metas: Inibir a síntese de corpúsculos e observar se e como isso afeta a formação e ativação de inflamassomos e a liberação de mediadores inflamatórios

11. A inibição da enzima ácido graxo sintase (FAS) reduz corpúsculos lipídicos, síntese e secreção de IL-1 β , e não interfere na atividade de caspase-1

A principal proposta deste trabalho é investigar a possível relação entre corpúsculos lipídicos e inflamassomos, duas estruturas muito envolvidas em respostas inflamatórias e anti-infecciosas.

Para isso, uma das ferramentas utilizadas foi diminuir, através do uso de um inibidor farmacológico, o número de corpúsculos lipídicos. Utilizamos um inibidor da enzima ácido graxo sintase (FAS), o C75 (2 μ g/mL), conhecido por reduzir parcialmente a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais (D'Ávila *et al.*, 2011). Com os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados ou não e tratados ou não com C75 fizemos a dosagem de IL-1 β por ELISA, buscando avaliar a ativação dos inflamassomos.

A inibição da enzima ácido graxo sintase leva à diminuição no número de corpúsculos lipídicos (figura 44A) e redução acentuada da secreção de IL-1 β (figura 44B) em macrófagos derivados de medula óssea infectados com BCG por 24 horas.

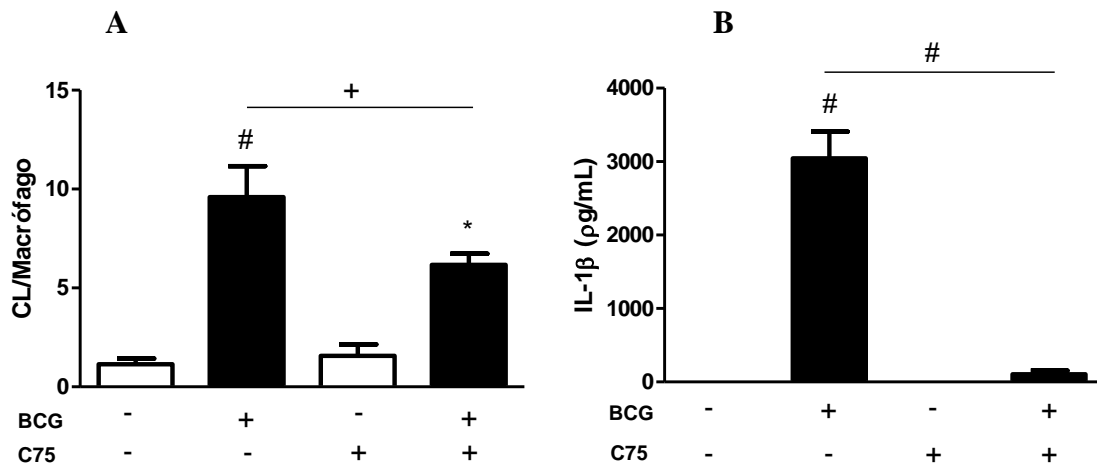


Figura 44: C75 diminui a formação de CL e inibe a secreção de IL-1 β . (A) Número de corpúsculos lipídicos em macrófagos derivados de medula óssea, infectados ou não com BCG por 24 horas e tratados ou não com C75 (2 μ g/mL). (B) Liberação de IL-1 β em sobrenadantes de macrófagos infectados ou não e tratados ou não. Os dados representam as médias \pm SEM dos resultados obtidos em 3 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando células infectadas não tratadas com C75 são comparadas com células não infectadas não tratadas; também quando são comparadas células infectadas tratadas com células infectadas não-tratadas em B. *, $p < 0,01$, quando células infectadas tratadas são comparadas com células tratadas não infectadas. +, $p < 0,05$, quando células infectadas não tratadas são comparadas com células infectadas tratadas com C75.

A pergunta natural após o achado de que a diminuição do número de corpúsculos pode estar associado à diminuição da atividade de inflamassomo é por qual via isso acontece.

Na tentativa de responder essa questão, investigamos a ativação da enzima caspase-1 em macrófagos infectados ou não com BCG durante 24 horas e tratados ou não com C75. Para isso, fizemos uma análise de citometria de fluxo, utilizando um marcador fluorescente de caspase-1, que se liga à enzima somente quando esta está ativada.

Podemos ver na figura 45 que o tratamento de macrófagos com C75 não interfere na ativação de caspase-1, visto que o percentual de células marcadas para caspase-1 ativa é similar em células infectadas, tratadas ou não com C75.

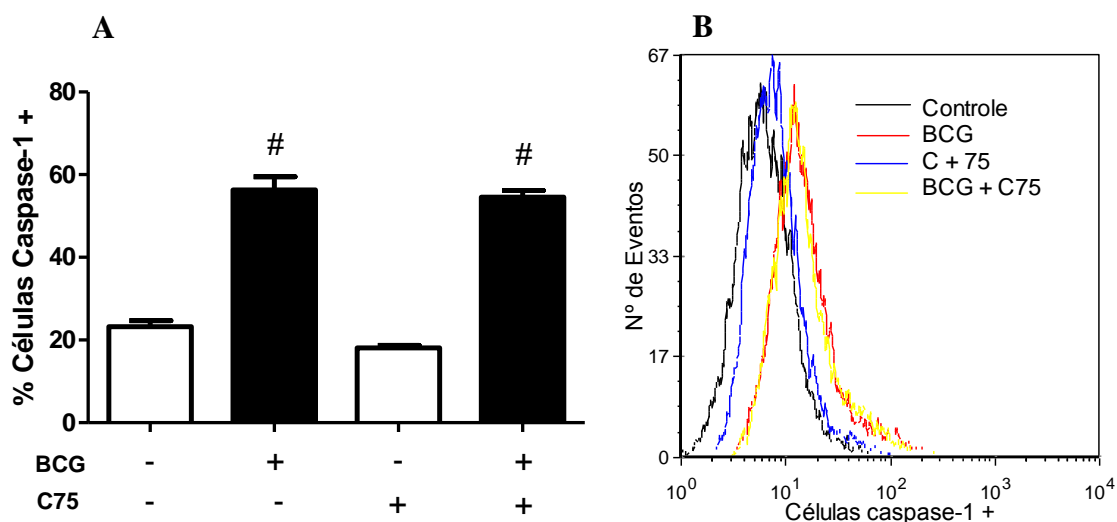


Figura 45: Expressão de caspase-1 ativada em macrófagos infectados por BCG e com a enzima ácido graxo sintase inibida. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados ou não e tratados ou não com C75 (2µg/mL), 30 minutos antes da infecção e também durante as 24 horas da infecção. As células foram marcadas com o kit Flica Caspase-1 e 10000 células foram lidas em citômetro de fluxo. (A) Gráfico representativo com as médias \pm SEM de resultados obtidos em, no mínimo, 2 experimentos independentes. (B) Histograma representativo da análise por citometria mostrando os picos de intensidade de fluorescência nas amostras controle e BCG não tratadas com C75 e C e BCG nas amostras tratadas com C75. #, $p < 0,001$, quando células infectadas e não tratadas com C75 são comparadas com células não infectadas e não tratadas; também quando são comparadas células infectadas e tratadas com células não infectadas e tratadas.

Como a atividade de caspase-1 não foi modulada por C75, continuamos a busca pelo motivo da acentuada redução na liberação de IL-1 β .

A partir de lisados celulares de macrófagos derivados de medula óssea, infectados ou não com BCG e infectados e tratados com C75, realizamos western blot para IL-1 β . Neste caso, estamos avaliando a expressão desta citocina ainda dentro da célula, antes de ser liberada.

Podemos ver na figura 46 que células não infectadas não apresentam bandas para IL-1 β . Já células infectadas mostram uma banda de 31kDa, tamanho da citocina em sua forma não clivada, e uma banda mais intensa de 17kDa, referente à forma clivada da enzima. Células tratadas com C75 e infectadas com BCG também não tem bandas para nenhuma das duas formas de IL-1 β . Isso mostra que a síntese desta citocina é inibida por C75.

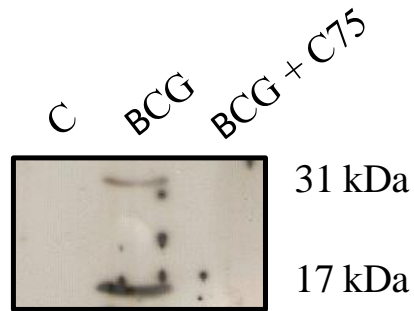


Figura 46: C75 inibe expressão de IL-1 β induzida por BCG. Macrófagos foram infectados ou não com BCG por 24 horas ou ainda tratados com C75 e infectados. Os lisados celulares foram submetidos à western blot.

12. Inibição de FAS também diminui liberação de citocinas pro-inflamatórias e de PGE₂, mas não de LTB₄

Baseados nos resultados anteriores, fomos avaliar se a inibição de FAS também afeta a liberação de outros mediadores inflamatórios, como outras citocinas e eicosanóides. Observamos que células infectadas com BCG por 24 horas liberam grandes quantidades de citocinas pro-inflamatórias TNF α e KC quando comparadas com células não infectadas. Também observamos liberação da citocina anti-inflamatória IL-10. Nas mesmas figuras vemos também que o tratamento com C75 reduz a secreção dessas três citocinas em células infectadas por BCG (figura 47 A, B e C).

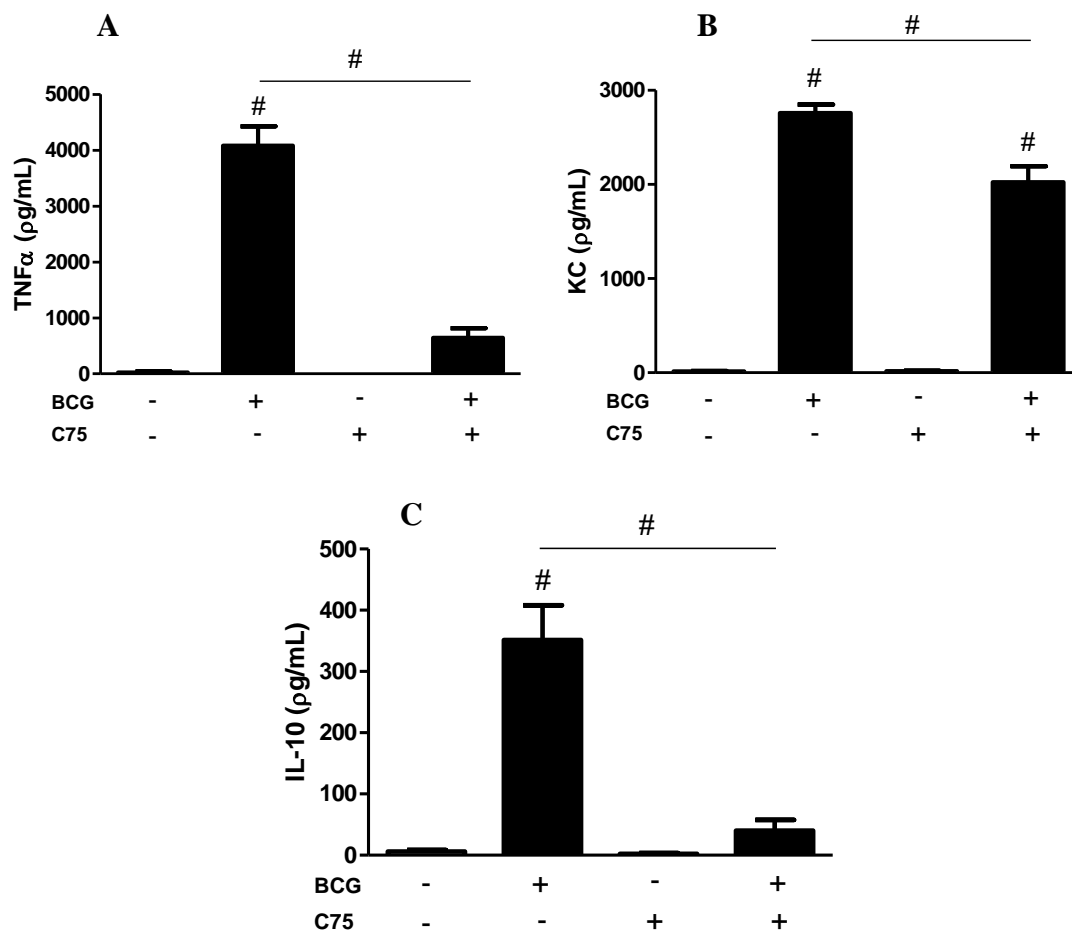


Figura 47: Secreção de TNF α , KC e IL-10. Macrófagos foram infectados ou não com BCG por 24 horas e tratados ou não com C75 (2 μ g/mL). Os dados representam as médias \pm SEM dos resultados obtidos em, no mínimo, 3 experimentos independentes. #, $p < 0,001$, quando células infectadas e não tratadas com C75 são comparadas com células não infectadas e não tratadas; também quando são comparadas células infectadas e não tratadas com células infectadas e tratadas.

No caso de KC, notamos que ainda ocorre uma significativa liberação desta citocina em células infectadas e tratadas com C75, mas mesmo assim a quantidade de KC liberada por estas células é menor que em células infectadas com BCG e não tratadas com o inibidor da ácido graxo sintase.

Quanto à liberação de eicosanóides, podemos ver que infecção induz secreção de PGE₂ e esta é significativamente inibida por C75 (figura 48A). A liberação de LTB₄ não foi modulada pela infecção no modelo de estudo empregado (figura 48B).

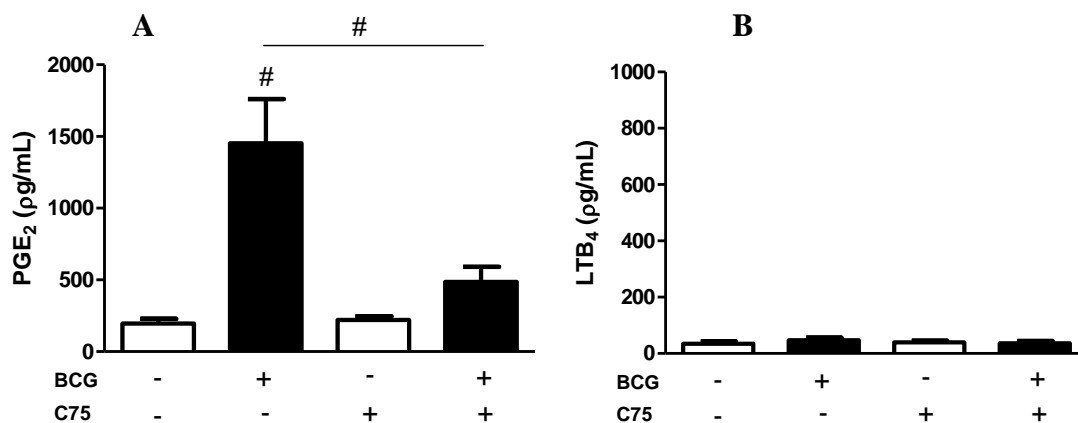


Figura 48: Secreção de PGE₂ (A) e LTB₄ (B). Macrófagos foram infectados ou não com BCG por 24 horas e tratados ou não com C75 (2µg/mL). Os dados representam as médias ± SEM dos resultados obtidos em, no mínimo, 3 experimentos independentes. #, p<0,001, quando células infectadas não tratadas com C75 são comparadas com células não infectadas não tratadas; também quando são comparadas células infectadas não tratadas com células infectadas tratadas com C75.

Nosso resultado de inibição da liberação de PGE₂ em macrófagos derivados de medula infectada com BCG e tratados com C75 está de acordo com trabalhos já publicados que mostram que a inibição de corpúsculos lipídicos induzida por C75 leva à diminuição da produção de PGE₂, apesar de C75 não inibir ciclooxigenase. Esse fenômeno foi visto em células de Schwann infectadas por *M. leprae* (Mattos *et al.*, 2011b), células de câncer de cólon (Accioly *et al.*, 2008) e macrófagos infectados por micobactérias (Almeida *et al.*, 2009; D'Avila *et al.*, 2008b).

DISCUSSÃO

Apesar da grande importância das infecções micobacterianas na saúde pública, muitos aspectos relativos a interação entre o patógeno e o hospedeiro permanecem nebulosos. Alguns desses aspectos envolvem as funções da resposta imune inata na defesa contra micobactérias. Dentre o arsenal de células e moléculas atuando na imunidade inata, destacamos os inflamassomos. Muito tem sido estudado sobre o papel destes complexos moleculares em diversas patologias locais e sistêmicas, mas no conhecimento sobre a participação dos inflamassomos nas infecções por micobactérias ainda existem muitas lacunas.

Vem se tornando bem estabelecida a relação entre as micobactérias e o metabolismo lipídico do hospedeiro. Corpúsculos lipídicos vem emergindo como organelas que tem uma função na sobrevivência e crescimento destes microorganismos. Mas até o momento, não há descrição de interação entre corpúsculos lipídicos e inflamassomos em modelo de infecção com *Mycobacterium bovis* BCG.

Trabalhos mostram a participação de mecanismos e receptores da imunidade inata na biogênese dos corpúsculos induzida por *M. bovis* BCG. Sendo os macrófagos células fagocíticas, D'Ávila *et al* (2006) investigaram se o fenômeno da fagocitose por si só seria capaz de induzir biogênese de corpúsculos lipídicos. Para isso, utilizaram microesferas de látex, *Mycobacterium smegmatis* (bactéria não patogênica) ou *M. bovis* BCG, todos sendo fagocitados por macrófagos. Os autores mostraram que a fagocitose de BCG foi capaz de aumentar o número de CL, o que não aconteceu com outros estímulos, concluindo que a fagocitose não é suficiente nem essencial para a formação destas organelas.

Para que ocorra fagocitose e outras respostas do hospedeiro frente a uma infecção micobacteriana, existe a necessidade do reconhecimento do patógeno e/ou de seus componentes. Esse reconhecimento é feito por receptores da imunidade inata, como TLRs e NLRs. Nosso grupo, usando animais deficientes em TLR2, mostrou que TLR2 é importante, mas não o único receptor envolvido na formação de CL induzida por BCG (D'Ávila *et al*, 2006 e 2007). Há relatos de cooperação entre receptores da imunidade inata no reconhecimento de micobactérias (Ferber *et al.*, 2005). Mas até o momento, nada foi descrito sobre a participação de receptores tipo Nod e/ou de inflamassomos na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por *M. bovis* BCG.

Inicialmente, fizemos uma avaliação para verificar se nosso modelo era capaz de gerar ativação de inflamassomos. Fizemos isso através da avaliação de caspase-1

ativada e da quantificação dos níveis de IL-1 β secretada por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados ou não com *M. bovis* BCG por 4, 8, 24 e 48 horas. Vimos que ocorre liberação desta citocina logo após 4 horas de infecção. Essa liberação se mantém em 8 horas, com pico máximo de secreção após 24 horas de infecção e diminuição em 48 horas, mas ainda com quantidades significativas desta citocina. Paralelamente à secreção de IL-1 β avaliamos a cinética da formação de CLs. Notamos que após 4 horas de infecção já há aumento do número destas organelas e esse número aumentado se mostra constante após 8, 24 e 48 horas.

Em busca de caracterizar a ativação de inflamassomos em nosso modelo, além de avaliarmos a liberação de IL-1 β , avaliamos também a expressão desta citocina no ambiente intracelular e a ativação de caspase-1. Mostramos a indução da expressão de IL-1 β em suas formas não clivada e clivada em macrófagos infectados por BCG. Além disso, mostramos a capacidade de BCG induzir ativação de caspase-1. Com isso, caracterizamos a ativação do complexo molecular chamado de inflamassomo em macrófagos derivados de medula óssea murina infectados com *M. bovis* BCG e concluímos que a ativação de inflamassomos ocorre concomitantemente com a biogênese de corpúsculos lipídicos.

Dando início às avaliações sobre a influência de NLRs e proteínas relacionadas sobre a biogênese de corpúsculos, vimos que os receptores Nod1, Nod2 não interferem na biogênese de corpúsculos lipídicos. Receptores Nod tem sido associados a resposta contra micobactérias. Em 2005, Ferwerda *et al* mostraram que TLR2, TLR4 e Nod2 desencadeiam vias não redundantes de reconhecimento de *Mycobacterium tuberculosis*, mas que podem sinergizar para a indução de resposta inflamatória intensa para combater a infecção. Yang *et al* (2007) constataram que a ativação de Nod2 por MDP ou *M. tb* leva à poliubiquitinação de Rip2 em macrófagos derivados de medula óssea. Mais recentemente, Brooks *et al* (2011) mostraram que macrófagos humanos pré-estimulados com MDP aumentam a secreção de TNF α e IL-1 β após infecção com *M. tuberculosis* ou BCG, de maneira dependente de Nod2 e Rip2. Mas não há relatos sobre a participação dos receptores Nod1 e Nod2 na indução da formação de corpúsculos lipídicos induzida por BCG.

Em nossos experimentos vimos que macrófagos de animais deficientes em Nod1 ou Nod2 e infectados com BCG tem número de corpúsculos lipídicos similares ao encontrado em macrófagos de animais selvagem. O fato de Nod1 e Nod2, isoladamente não terem efeito sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos nos leva a pensar sobre a interação entre estes dois receptores, conhecidamente envolvidos no reconhecimento de

micobactérias e seus PAMPs. Portanto, será interessante avaliar a formação de CL em macrófagos derivados de medula óssea de animais Nod1/Nod2^{-/-}. No entanto, é pouco provável que a ausência dos dois receptores leve à alterações no número de corpúsculos lipídicos, visto que em ausência de Rip2, que é uma importante proteína adaptadora da via dos Nods, também não ocorre modulação do número de corpúsculos.

Seguindo a pesquisa sobre a participação de componentes da via dos inflamassomos na biogênese de corpúsculos lipídicos, investigamos o papel de ASC e caspase-1 nesse fenômeno. Tekippe *et al* (2010) mostraram que a formação de granuloma e a defesa do hospedeiro na infecção crônica por *M. tb* requer ASC, mas não caspase-1 ou NLRP3. Os autores sugerem que ASC possa exercer um papel independente de inflamassomo durante infecções micobacterianas crônicas, colaborando para a contenção da bactéria em granulomas. Inflamassomos clássicos são compostos por um tipo de NLR, a proteína ASC e caspase-1. Para avaliar a influência de ASC e caspase-1 na biogênese de CLs utilizamos macrófagos derivados de medula de camundongos deficientes em ASC e caspase-1. Diferentemente do que esperávamos, ocorreu uma potencialização do número de CLs em macrófagos ASC^{-/-} e caspase-1^{-/-} infectados com BCG. Isso mostra que estes importantes componentes da via dos inflamassomos regulam negativamente a formação de CLs em macrófagos infectados por BCG e estabelece uma relação entre essas duas estruturas tão importantes para a resposta inflamatória. O aumento do número de CLs em células deficientes em ASC e caspase-1 não parece ser dependente de IL-1 β e IL-18, citocinas liberadas pela ativação dos inflamassomas. Isso porque em ausência dos receptores destas citocinas, IL-1R1 e IL-18R, respectivamente, não há modulação no número de CLs em macrófagos infectados.

De maneira similar ao que ocorre com Nod2, ASC e caspase-1 também foi observada a importância do receptor NLRP3 no combate à infecções micobacterianas. Chen *et al* (2010) mostraram que a ativação do inflamassoma NLRP3 restringe a infecção por *Mycobacterium kansasii* em macrófagos da linhagem THP-1. Além disso, parece que Nod2 e NLRP3 podem cooperar para a geração de IL-1 β , citocina importante na resposta à micobactérias (Marina-Garcia *et al.*, 2008). Em nosso modelo, observamos, de modo semelhante ao visto em ausência de ASC e caspase-1, que o bloqueio de NLRP3 também favoreceu o aumento do número de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com BCG. Mais uma vez, parece que inflamassomos regulam negativamente a biogênese de corpúsculos lipídicos.

NLRP3 é um receptor ativado por diversos PAMPs e DAMPs (revisado por Franchi *et al.*, 2012). Um dos mecanismos descritos para essa ativação é através do efluxo de potássio intracelular, que pode ocorrer por ativação do receptor purinérgico P2X₇ através de ATP. ATP pode funcionar como DAMP, sendo liberado de células que sofreram algum dano. Além do estímulo com BCG, investigamos se a ativação do inflamassomo NLRP3 com ATP ou LPS (1º sinal) + ATP levaria à modulação na formação de corpúsculos lipídicos. De fato, o próprio ATP sozinho, sem estímulo prévio, foi capaz de induzir aumento no número dessas organelas. Curiosamente, o pré-tratamento dos macrófagos com LPS, seguido pelo estímulo com ATP também induziu aumento do número de CLs, mas em menor quantidade quando comparada com células tratadas somente com ATP. Visto que ATP aumenta CLs, a pergunta natural é por qual via isso ocorreria e o candidato mais provável é o receptor de ATP, P2X₇. Então, bloqueamos este receptor e verificamos que, de fato, este receptor purinérgico está envolvido na biogênese de CLs mediada por ATP.

Então nos perguntamos se o receptor P2X₇, que contribui para a ativação do inflamassomo NLRP3 também poderia estar envolvido na formação de CL induzida por BCG. Novamente bloqueamos o receptor P2X₇ e infectamos os macrófagos com BCG. De maneira contrária ao observado para ATP, o bloqueio de P2X₇ levou ao aumento da formação de CLs.

Inicialmente nossa hipótese era de que a ausência de receptores como Nod2 e NLRP3 e de outras proteínas estudadas levaria a uma diminuição da formação de corpúsculos lipídicos. Isso porque na ausência de TLR2, por exemplo, existe essa diminuição após estímulo com BCG. Para nossa surpresa, em ausência de ASC, caspase-1, NLRP3 e P2X₇ ocorre um aumento do número de CL induzido por BCG. Parece-nos, que a presença destas proteínas restringe, de alguma maneira, a biogênese destas organelas lipídicas. Isso pode mostrar que existe uma regulação antagônica entre TLRs e NLRs na formação de corpúsculos lipídicos. Enquanto TLR2 favorece a biogênese após o reconhecimento de BCG, a ativação da via de NLRs e inflamassomos poderia regular negativamente a indução de CL. Essa é uma observação inédita, visto que, até hoje nada foi descrito na literatura sobre a interação de corpúsculos lipídicos e inflamassomos. Nosso laboratório vem demonstrando ao longo dos anos que BCG pode utilizar os lipídios presentes nos CL para favorecer sua replicação e sobrevivência, por isso, especulamos que o aumento de CL visto em condições de inibição de inflamassomos seja mais uma estratégia micobacteriana para diminuir a resposta imune

e propiciar condições para sua persistência. Se esta hipótese está correta e quais os mecanismos intracelulares associados à este fenômeno será motivo de intensa pesquisa.

Uma das funções descritas dos corpúsculos lipídicos é a formação de eicosanóides. Diversos componentes envolvidos na biosíntese de eicosanóides tem sido evidenciados nos CLs (revisado por Bozza *et al.*, 2009).

Em nossos experimentos, não observamos diferenças significativas na liberação de eicosanóides em macrófagos derivados de medula óssea de animais deficientes em Nod1, Nod2, ASC, caspase-1, IL-1R1, IL-18R, infectados com BCG, quando comparados aos macrófagos de animais selvagens.

Um fato observado em nossos experimentos foi a diminuição da secreção de PGE₂, induzida por BCG, em condições de inibição de NLRP3. Nós especulamos que o aumento dos lipídios intracelulares, gerados pelo aumento do número de CL em macrófagos com diminuída atividade de NLRP3 seja utilizado para gerar outros mediadores lipídicos, por exemplo, os envolvidos nos processos de resolução da inflamação, como resolvinas e lipoxinas. Isso porque pode haver alteração da função dos CLs dependendo do estímulo e do tipo celular envolvido.

Uma vez que CL estão altamente envolvidos na síntese de mediadores lipídicos, examinamos se o aumento do número de CL induzido por ATP modularia a liberação dos eicosanóides PGE₂ e LTB₄. Notamos que não há diferença significativa na secreção destes eicosanóides em macrófagos derivados de medula óssea tratados com ATP sozinho. Somente quando utilizamos LPS + ATP obtivemos uma resposta positiva para a liberação de PGE₂ e LTB₄. Um trabalho recente mostrou que LTB₄ é produzido após ativação de macrófagos com ATP e isso contribui de maneira importante para a eliminação de *Leishmania amazonensis* (Chaves *et al.*, 2014). Isso ocorre porque P2X₇ ativado por ATP leva ao aumento de cPLA₂, que aumenta o ácido araquidônico disponível para ação de ciclooxigenases e lipoxigenases para a formação dos mediadores lipídicos (Costa-Junior *et al.*, 2011). O fato de não termos visto aumento da liberação de LTB₄ após estímulo com ATP, diferentemente do trabalho citado acima, nos leva a pensar se, em nosso modelo, a via de ativação de P2X₇ não estaria levando a formação de outros mediadores lipídicos, como lipoxinas e resolvinas.

von Moltke *et al* (2012) foram um dos primeiros grupos a mostrar uma ligação entre inflamassomos e eicosanóides. Eles notaram uma rápida indução da liberação de diversos mediadores lipídicos, inclusive PGE₂ e LTB₄, em macrófagos peritoneais residentes tratados por 30 minutos com derivados de flagelina, que ativam o inflamassomo Naip5/NLRC4. Em contrapartida, nenhuma alteração foi vista em

macrófagos derivados de medula óssea ou macrófagos peritoneais obtidos com tioglicolato tratados sob as mesmas condições. Os autores sugerem que essa diferença pode ocorrer devido à necessidade de resposta rápida em macrófagos de portas de entrada de patógenos. Talvez o fato de a grande maioria dos estudos sobre inflamassomos serem realizados em macrófagos derivados de medula óssea explique porque a ligação entre inflamassomos e eicosanóides ainda não havia sido descrita.

Em nosso trabalho observamos um aumento de PGE₂ e de LTB₄ induzido pelo tratamento dos macrófagos com LPS e, em seguida, ATP. Estes estímulos levam à ativação de vias dependentes de TLRs e de NLRP3. No trabalho citado acima vemos um aumento destes eicosanóides após ativação do inflamassomo Naip5/NLRC4. Ainda, Amaral *et al* (2012) mostraram que LTB₄ induzido pela estimulação de macrófagos com MSU (cristais de urato monossódico monohidratado) leva a geração de espécies reativas de oxigênio, que ativa NLRP3 a produzir IL-1 β de maneira dependente de caspase-1. Sendo assim, confirmamos os dados da literatura no sentido de que a ativação de inflamassomos leva ao aumento da secreção de mediadores lipídicos.

Além dessas evidências de relação entre inflamassomos e mediadores lipídicos solúveis, recentemente novos trabalhos vem demonstrando a relação entre inflamassomos e metabolismo lipídico. Im *et al* (2011) mostraram que macrófagos deficientes em SREBP-1a, um regulador chave dos níveis de lipídios intracelulares, ocorreu reduzida expressão de NLRP1a, da atividade de caspase-1 e da secreção de IL-1 β após estímulo com LPS, comparando com macrófagos derivados de medula de animais selvagem.

Nosso laboratório demonstrou que LDL oxidado (Ox-LDL) é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (Silva *et al.*, 2009). Seguindo este fato, Liu *et al* (2014) mostraram que a secreção de IL-1 β induzida por Ox-LDL é um dos mecanismos responsáveis pela formação de células espumosas. Os autores pensaram em um modelo onde ox-LDL, estimulando macrófagos de linhagem humanos, leva não somente a secreção de IL-1 β , mas também a transcrição e a síntese desta citocina. Os autores relatam ainda que essa secreção foi caspase-1 dependente e também dependente de ativação do inflamassomo NLRP3. A ativação deste inflamassomo no modelo proposto pelo grupo ocorre por 3 das vias principais descritas para formação do inflamassomo NLRP3: produção de espécies reativas de oxigênio, efluxo de potássio e perturbação da estabilidade dos lisossomos. Além disso, observaram que a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por Ox-LDL é dependente do receptor scavenger CD36. Almeida *et al* (2014) mostraram que CD36 é um dos receptores envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos induzidos por BCG em macrófagos.

Outro trabalho relacionando inflamassomos e metabolismo lipídico mostrou a deposição de lipídios em macrófagos estimulados com ATP e esta deposição acelera a formação de células espumosas (Li *et al.*, 2014). ATP também se mostrou capaz de induzir a formação e a ativação de NLRP3, com ativação de caspase-1 e liberação de IL-1 β . Também houve deposição lisossomal de lipídios e estes acúmulos de lipídios são dependentes de ASC. Os autores concluem que a ativação de NLRP3 mesmo com estímulos não lipídicos, como é o caso do ATP, favorece a deposição de lipídios nos macrófagos e a participação destas células na aterosclerose. Nosso dados parecem ter apoio neste trabalho, pelo menos parcialmente, já que vimos que ATP é capaz de induzir a formação de CL, mas, se usado, sozinho, não induz liberação de IL-1 β , diferentemente do que foi descrito pelo grupo de Li.

Corpúsculos lipídicos vem sendo descritos como organelas importantes em diversos fenômenos fisiológicos e patológicos, sendo capaz de compartimentalizar diferentes proteínas dependendo do tipo celular e do estímulo (revisado por Bozza *et al.*, 2009). Em 2011, Jiang e Chen mostraram a presença da proteína viperina na superfície de corpúsculos lipídicos. Esta proteína é produto de um gene estimulado por interferon, com propriedades antivirais. Neste trabalho, os autores descrevem que viperina na superfície dos CLs serve como plataforma para reunião de proteínas sinalizadoras da via de TLRs 7 e 9, que reconhecem PAMPs virais em compartimentos endossômicos. Essa via de sinalização desencadeia a geração de IFN, que interfere na replicação viral. Ainda em 2011, Saitoh *et al* encontraram TRAF6, IRAK1 e MyD88 em menor quantidade em corpúsculos lipídicos de maneira dependente de viperina após estimulação de TLR9 em células dendríticas. Sendo assim, foi mostrada a relação entre CLs e proteínas relacionadas à imunidade inata e isso é um dos fatores que nos leva à especular sobre a participação de CLs em outras vias da imunidade inata, como a dos inflamassomos.

Portanto, na segunda parte desta tese, buscamos observar a capacidade de corpúsculos lipídicos de servir de sítio de compartimentalização para receptores tipo Nod e proteínas relacionadas. Observamos a presença dos receptores Nod1, Nod2 e NLRP3, além da proteína adaptadora Rip2, da enzima caspase-1 e da citocina IL-1 β nos corpúsculos lipídicos de macrófagos infectados com BCG. A proteína adaptadora da via dos inflamassomos, ASC, não co-localiza com os CL. A presença de caspase-1 nos CL e a ausência de ASC nestas organelas foi vista tanto por microscopia confocal, quanto por análise de frações subcelulares, dentre essas, as frações lipídicas, através de western blot. Curiosamente, IL-1 β foi vista nos corpúsculos por microscopia confocal, mas não

nas frações lipídicas analisadas por western blot. Nod1, Nod2, NLRP3 e Rip2 foram vistas somente por microscopia, ainda nos falta realizar as análises da presença ou não dessas proteínas nas frações subcelulares, entre as quais, as frações lipídicas, onde se encontram os corpúsculos lipídicos.

Em nossos experimentos de co-localização, encontramos somente a forma não-clivada (45kDa) de caspase-1 nos corpúsculos lipídicos de macrófagos infectados por *M. bovis* BCG. As subunidades geradas após ativação de caspase-1, com 20kDa e a subunidade com atividade catalítica, de 10kDa, não foram observadas nas frações lipídicas geradas após gradiente em sacarose e ultracentrifugação. Devemos ainda tentar observar se encontraríamos a forma ativa de caspase-1 no corpúsculo em outros momentos da infecção, uma vez que o resultado descrito acima foi avaliado em um único ponto, de 24 horas após infecção por BCG.

Ainda, sobre os experimentos de co-localização, nos surpreendeu a presença de ASC no núcleo de macrófagos peritoneais tanto de animais não infectados quanto, de maneira mais pronunciada, em células de animais infectados por *M. bovis* BCG. Bryan *et al* (2010) descrevem que ASC encontra-se presente no núcleo de células em repouso, que uma vez ativadas, levam à migração de ASC para o citosol, onde realiza sua função como proteínas adaptadora de alguns inflamassomos. Além disto, este trabalho também descreve a existência de isoformas de ASC, quatro diferentes, geradas por splicing alternativo. ASC e ASC-b são capazes de se associar à caspase-1 e NLRP3. Já a forma ASC-c é tida como inibitória, não se associando com NLRP3, somente com caspase-1. E ASC-d não co-localiza com caspase-1 nem com NLRP3 e falta a habilidade de funcionar como adaptador de inflamassomo e sua função precisa e relação com ASC precisa de mais investigação. Maiores investigações serão necessárias para averiguar a função de ASC no núcleo dos macrófagos estudados em nosso trabalho. Além disso, poderá ser interessante avaliar a questão de ASC não estar nos corpúsculos e estar no núcleo em outros tempos de infecção por BCG.

Até hoje, que seja do nosso conhecimento, nada havia sido descrito quanto à presença de receptores tipo Nod e proteínas associadas em corpúsculos lipídicos. Maiores investigações são necessárias para revelar a relevância fisiológica e funcional destes achados.

Após o achado de caspase-1 não ativa nos CLs, pensamos na hipótese de corpúsculos lipídicos estarem sequestrando esta enzima para impedir a ativação dos inflamassomos. Então, investigamos se a inibição da formação de corpúsculos lipídicos influenciaria a liberação de IL-1 β e a ativação de caspase-1 em macrófagos derivados de

medula óssea infectados com BCG. Para isso pré-tratamos ou não os macrófagos com C75, um inibidor da enzima ácido graxo sintase (FAS), que impede o aumento do número de CL em células infectadas com BCG. Vimos que, de fato, a inibição da formação de CLs leva à uma diminuição importante na secreção de IL-1 β , mas sem alterar a atividade da enzima caspase-1. Desta maneira concluímos que corpúsculos lipídicos não são importantes para a ativação de inflamassomos. O que caspase-1 faz dentro dos CLs ainda não sabemos, mas encaminharemos a pesquisa no sentido de descobrir se ela poderia atuar sobre outros substratos em nosso modelo de estudo. Além de também pretendermos avaliar a co-localização de caspase-1 com CLs em outros tempos de infecção.

Além disso, inibindo a formação de CLs, mostramos também a redução da liberação de outras citocinas envolvidas na resposta inflamatória, como TNF- α , KC e IL-10, e do mediador lipídico PGE₂. A inibição da formação de CL e da secreção de PGE₂ estão de acordo com alguns trabalhos já publicados por nosso grupo, em modelos como macrófagos peritoneais tratados com C75 e infectados com BCG (D'Ávila *et al.*, 2008) ou *Tripanossoma cruzi* (D'Ávila *et al.*, 2011). Falta avaliar se o inibidor da enzima ácido graxo sintase também é capaz de reduzir a transcrição de IL-1 β . Parece-nos que a inibição de FAS bloqueia as respostas dependentes da ativação de NF- κ B, um dos principais fatores transcricionais associados à resposta inflamatória e ativado via TLRs, Nod1 e Nod2 e MAPKs após infecção por BCG em macrófagos.

O resultado da redução de citocinas pro-inflamatórias em nosso modelo, encontra apoio em trabalho publicado recentemente, mostrando que C75 é capaz de reduzir a colite experimental em camundongos por diminuir os mediadores inflamatórios envolvidos, principalmente as citocinas TNF, IL-1 β , MIP2, KC, além de reduzir a expressão das enzimas Cox2 e NO sintase induzida (Matsuo *et al.*, 2014).

Citocinas pro-inflamatórias da família IL-1 desempenham um importante papel nos mecanismos de defesa anti-micobacterianos do hospedeiro (Kleinnijenhuis *et al.*, 2009). A própria IL-1 β liberada, sinalizando via seu receptor IL-1R1 pode levar à produção de intermediários de oxigênio e nitrogênio, que tem alto poder microbicida. As citocinas desta família favorecem também a ativação de linfócitos que liberam IFN- γ , ativando os macrófagos e favorecendo o killing das bactérias. Sendo assim, a inibição de inflamassomos, inibiria a geração de IL-1, o que seria um dos fatores que dificultaria o killing e favoreceria à sobrevivência bacteriana.

Nosso dados de liberação de IL-1 β após estímulo com LPS ou ATP estão de acordo com outros trabalhos publicados. Vimos que nenhum desses dois estímulos,

usados isoladamente, são capazes de induzir a secreção desta importante citocina. Quanto ao LPS, He *et al* (2013), usando a mesma concentração que nós usamos de LPS, em macrófagos derivados de medula óssea, não observaram secreção de IL-1 β . Quando administramos LPS e em seguida ATP vemos uma secreção intensa de IL-1 β . Isso pode ser explicado porque o LPS, atuando via TLR4, leva à geração de pro-IL-1 β e somente com um segundo sinal, indutor de inflamassomo, como o ATP, ocorre a liberação desta citocina para o meio extracelular, após clivagem da pro-forma, em forma madura pela caspase-1.

Fairbairn *et al* (2001) mostraram que, além de seu papel na ativação de inflamassomos, ATP induz o killing de micobactérias por vias que dependem de P2X₇, fosfolipase D, indução da formação de fagolisossomo e independem da ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os autores sugerem que a ativação de fosfolipase D aumente os níveis de ácido fosfatídico, um conhecido indutor de fusão de membranas endossomais. Além disso, fosfolipase D também ativa outras fosfolipases, como a fosfolipase A₂, que também é induzida em macrófagos tratados com ATP (Balboa *et al.*, 1999) e promove a fusão do fagossomo com o lisossomo através da geração de ácido araquidônico. Sendo assim, ATP induziria o killing micobacteriano por favorecer a fusão fagolisossomal.

O principal desdobramento desta tese virá das pesquisas sobre como a ausência das proteínas ASC e caspase-1 ou a inibição dos receptores P2X₇ e NLRP3 levam ao aumento do número de corpúsculos lipídicos. Além disso, pesquisaremos a implicância deste fenômeno para o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória. Também merece ser investigado mais a fundo o fato do aumento de CL, após inibição de NLRP3, não levar ao aumento da liberação de PGE₂, e, pelo contrário, causar sua diminuição.

Disfunções nas vias de sinalização dos inflamassomos são cada vez mais associadas ao início de processos inflamatórios, doenças auto-imunes e outras desordens. A regulação da formação e funções dos corpúsculos lipídicos também está associada à resposta imune contra patógenos, tumores e inflamação. O entendimento de como as duas vias, com seus pontos em comum, se associam pode colaborar para a elaboração de estratégias visando combater os danos ao hospedeiro gerado pelas patologias e ativação dos inflamassomos e dos corpúsculos lipídicos.

CONCLUSÕES

- **PARTE 1: Avaliação da implicação dos receptores nod-like e de proteínas relacionadas na biogênese dos corpúsculos lipídicos**
 - ✓ Além de induzir formação de corpúsculos lipídicos, BCG também induz ativação de inflamassomos em macrófagos derivados de medula óssea
 - ✓ Nod1, Nod2, Rip2, IL-1R1 e IL-18R não interferem na biogênese de CL, nem na liberação de IL-1 β e de PGE₂
 - ✓ A ausência de ASC ou caspase-1 e o bloqueio de NLRP3 ou P2X₇ aumenta a formação de CL induzida por BCG
 - ✓ ASC e caspase-1 não modulam a liberação de eicosanóides
 - ✓ O bloqueio de NLRP3 reduz a liberação de IL-1 β e de PGE₂
 - ✓ ATP induz biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dependente de P2X₇
 - ✓ A ativação de inflamassomos por LPS + ATP leva ao aumento da liberação de eicosanóides

- **CONCLUSÃO GERAL:** Em conjunto, esses dados nos mostram que a componentes do inflamassomo ou a ativação deste complexo molecular regulam negativamente a biogênese de corpúsculos lipídicos, induzida por BCG, em macrófagos derivados de medula óssea.

- **PARTE 2: Avaliar o papel dos corpúsculos lipídicos como sítio de compartimentalização de proteínas do complexo inflamassomo e o seu impacto na ativação dos inflamassomos e liberação de mediadores inflamatórios**

- ✓ BCG também induz ativação de inflamassomos no modelo *in vivo*
- ✓ ASC não co-localiza com CL
- ✓ NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , Nod1, Nod2, Rip2, encontram-se associados aos CL
- ✓ Além de reduzir a formação de CL induzida por BCG, a inibição da enzima ácido graxo sintase leva à redução da síntese e da liberação de IL-1 β , mas não interfere na atividade de caspase-1
- ✓ A inibição de FAS também diminui liberação de citocinas pro e anti-inflamatórias, além de PGE₂

- **CONCLUSÃO GERAL:** Corpúsculos lipídicos induzidos por BCG podem servir como sítio de localização para proteínas do complexo inflamassomo, mas estas organelas lipídicas parecem não influenciar na na ativação dos inflamassomos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, Kaufmann C, Morgado-Diaz JA, Bozza PT, Viola JP. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E₂ synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1732-1740.

Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro C, Töröcsik D, D'Avila H, Dezsö B, Magalhães KG, Castro-Faria-Neto HC, Nagy L, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol* 2009; 183:1337-1345.

Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR, Bozza PT. PPAR γ expression and function in Mycobacterial infection: roles in lipid metabolism, immunity, and bacterial killing. *PPAR Res* 2012.

Almeida PE, Roque NR, Magalhães KG, Mattos KA, Teixeira L, Maya-Monteiro CM, Almeida CJ, Castro-Faria-Neto, Ryffel B, Quesniaux VFJ, Bozza PT. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochim et Biophys Act* 2014; 1841: 97-107.

Amaral FA, Costa VV, Tavares LD, Sachs D, Coelho FM, Fagundes CT, Soriani FM, Silveira TN, Cunha LD, Zamboni DS, Quesniaux V, Peres RS, Cunha TM, Cunha FQ, Ryffel B, Souza DG, Teixeira MM. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B₄ in a murine model of gout. *Arthritis Rheum* 2012; 64(2): 474-484.

Andrade BTC, Maia Monteiro R, Cosgrove C, Castello-Branco LRR. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 459-465.

Arpaia N, Barton GM. The impact of toll-like receptors on bacterial virulence strategies. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16(1): 17-22.

Balboa MA, Balsinde J, Johnson CA, Dennis EA. Regulation of arachidonic acid mobilization in lipopolysaccharide-activated P388D(1) macrophages by adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 1999; 274: 36764.

Barber KDM, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, Cheever A, Kugler D, Hieny S, Caspar P, Núñez G, Schlueter D, Flavell RA, Sutterwala FS, Sher A. Caspase-1 independent IL-1 β production is critical for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and does not require TLR signaling in vivo. *J Immunol* 2010; 184: 3326-3330.

Bauernfeind F, Hornung V. Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med* 2013; 5(6): 814-26.

Becker CE, O'Neil LAJ. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 239-248.

Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7: 391-399.

Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(2): 99-109.

Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 1643–1651.

Bourhis LL, Benkot S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Transact* 2007; 35(6): 1479-1484.

Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(6): 540-51.

Bozza PT, Payne JL, Goulet JL, Weller PF. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med* 1996; 183: 1515-1525.

Brasaemle DL, Wolins NE. Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* 2006 Jan; Chapter 3:Unit 3.15.

Brooks MN, Rajaram MVS, Azad AK, Amer AO, Valdivia-Arenas MA, Park JH, Núñez G, Schlesinger LS. Nod2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages. *Cell Microbiol* 2011; 13(3): 402-418.

Bryan NB, Dorfleutner A, Kramer SJ, Yun C, Rojanasakul Y, Stehlik C. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. *J Inflamm* 2010, 7:23.

Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioassa* 2012; 34: 218-225.

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Núñez G, Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003; 4(7): 702-707.

Chaves MM, Marques-da-Silva C, Monteiro APT, Canetti C, Coutinho-Silva R. Leukotriene B4 modulates P2X7 receptor-mediated *Leishmania amazonensis* elimination in murine macrophages. *J Immunol* 2014; 192.

Chen CC, Tsai SH, Lu CC, Hu ST, Wu TS, Huang TT, Saïd-Sadier N, Ojcius DM, Lai HC. Activation of an NLRP3 inflammasome restricts *Mycobacterium kansasii* infection. *PLoS One* 2012; 7(4):e36292.

Costa-Junior HM, Marques-da-Silva C, Vieira FS, Monção-Ribeiro LC, Coutinho-Silva R. Lipid metabolism modulation by the P2X7 receptor in the immune system and during the course of infection: new insights into the old view. *Purinergic Signal* 201; 7(4):381-92.

Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs : a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol* 2006; 27(8):352-357.

Damgaard RB, Gyrd-Hansen. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity. *Discov Med* 2011; 11(58): 221-31.

D'Ávila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 1308-1315.

D'Ávila H, Almeida PE, Roque NR, Castro-Faria Neto HC, Bozza PT. Toll-like-receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infect Immun* 2007; 75(3): 1507-11.

D'Ávila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 2006; 176(5):3087-97.

D'Ávila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria Neto HC, Melo RCN, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E₂ production by macrophages. *Cell Microbiol* 2008b; 10(12): 2589-2604.

D'Ávila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 2011; 204(6):951-961.

Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death and Dis* 2012; 3: 1-9.

DeYoung B, Innes RW. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* 2006; 7 (12):1243-1249.

- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519-550.
- Eisenbarth SC, Flavell RA. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. 2009. *EMBO Mol Med*, 1(2):92-98.
- Elinav E, Strowig T, Henao-Meija J, Flavell RA. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunit* 2011; 34: 665-679.
- Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, Lammas DA. ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X₇-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* 2001; 167: 3300-3307.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. The P2X₇ receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 2006; 176(7): 3877-3883.
- Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Bourhis LL, Jong DJ, Langenberg DML, van Crevel R, Adema GJ, Ottenhoff THM, van der Meer JWM, Netea MG. Nod2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathogen* 2005; 1(3): 279-285.
- Ferwerda G, Kramer M, de Jong D, Piccini A, Joosten LA, DevesaGiner I, Girardin SE, Adema GJ, van der Meer JWM, Kullberg BJ, Rubartelli A, Netea MG. Engagement of Nod2 has a dual effect on proIL-1 β mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1 β . *Eur J Immunol* 2008; 38: 184-191.
- Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, Oliveira MF, Oliveira PL, Graça-Souza AV, Bozza MT. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2007; 282(28): 20221-9.
- Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim YG, Nuñez G. Intracellular Nod-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* 2008; 10(1): 1-8.
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009; 227: 106-128.

Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* 2012; 13(4): 325–332.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zähringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; 300;1584-1587.

Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J. NF- κ B is a negative regulator of IL-1 β secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKK β . *Cell* 2007; 130: 918–931.

Gross DN, Miyoshi H, Hosaka T, Zhang HH, Pino EC, Souza S, Obin M, Greenberg AS, Pilch PF. Dynamics of lipid droplet-associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin. *Mol Endocrinol* 2006; 20(2):459-66.

Guma M, Ronacher L, Liu-Bryan R, Takai S, Karin M, Corr M. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum* 2009; 60(12):3642-50.

He Y, Franchi L, Núñez G. TLR agonists stimulate NLRP3-dependent IL-1 β production independently of the purinergic P2X₇ receptor in dendritic cells and in vivo. *J Immunol* 2013; 190 (1):334-9.

Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol* 2012; 13: 321-324.

Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP, Buckley KM, Brockton V, Nair SV, Berney K, Fugmann SD, Anderson MK, Pancer Z, Cameron RA, Smith LC, Rast JP. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* 2006; 300(1): 349-65.

Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, Akira S. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol* 1999; 162: 5041–5044.

Huynh KK, Joshi SA, Brown EJ. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 464-472.

Im SS, Yousef L, Blaschitz C, Liu JZ, Edwards RA, Young SG, Raffatellu M, Osborne TF. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element-binding protein-1a. *Cell Metab* 2011; 13(5):540-9.

Jiang X, Chen Z. Viperin Links Lipid Bodies To Immune Defense. *Immunity* 2011; 34(3): 285–287.

Jo EK. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 279-286.

Johnston JB, Rahman MM, McFadden G. Strategies that modulate inflammasomes—insights from host-pathogen interactions. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 261-274.

Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, van Deventer SJ, van Der Poll T. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; 182: 902–908.

Kahlenberg JM, Lundberg KC, Kertesz SB, Qu Y, Dubyak GR. Potentiation of caspase-1 activation by the P2X₇ receptor is dependent on TLR signals and requires NK-kappaB-driven protein synthesis. *J Immunol* 2005; 175: 7611-7622.

Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle LV, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Girma MR, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 2011; 479: 117-121.

Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszyński A, Forsberg LS, Carlson RW, Dixit VM.

Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4.

Science 2013; 341(6151): 1246-9.

Kleinnijenhuis J, Joosten LAB, van de Veerdonk EL. Transcriptional and inflammasome mediated pathways for the induction by *Mycobacterium tuberculosis*.

Eur J Immunol 2009; 39 (7): 1914-1922.

Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galán JE, Núñez G, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. Nature 2002; 416:194–199.

Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. Immunity 2011; 34(4): 514-526.

Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, Bartfai T, Solorzano C, Moldawer LL, Chizzonite R. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor - deficient mice. J Immunol 1997; 159: 2452–2461.

Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. Nat Rev Immunol 2011; 11(3): 213-20.

Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme. Science 1995; 267: 2000-2003.

Li X, Zhang Y, Xia M, Gulbins E, Boini KM, Li PL. Activation of Nlrp3 inflammasomes enhances macrophage lipid-deposition and migration: implication of a novel role of inflammasome in atherogenesis. Plos One 2014; 9(1):87552.

Liu HQ, Zhang XY, Edfeldt K, Nijhuis MO, Idborg H, Bäck M, Roy J, Hedin U, Jakobsson PJ, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G, Hansson GK, Yan Z. Nod2-mediated innate immune signaling regulates the eicosanoids in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013; 33(9): 2193-201.

Liu W, Yin Y, Zhou Z, He M, Dai Y. OxLDL-induced IL-1 beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflamm Res* 2014; 63(1):33-43.

Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 31-40.

Marina-García N, Franchi L, Kim YG, Miller D, McDonald C, Boons GJ, Núñez G. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol* 2008; 15: 180(6):4050-7.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Molecular Cell* 2002; 10: 417–426.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:229-65.

Massis LM, Zamboni DS. Innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Front in Microbiol* 2013; 2(109): 1-7.

Matsuo S, Yang WL, Aziz M, Kameoka S, Wang P. Fatty acid synthase inhibitor C75 ameliorates experimental colitis. *Mol Med* 2014; 20:1-9.

Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN, Manso PPA, Sarno EN, Bozza PT, Pessolani MCV. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol* 2011; 13(2): 259-273.

Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, Pessolani MCV, Bozza PT. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-

infected Schwann cells: Immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol* 2011b; 187: 2548-2558.

Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1089–1097.

Melo RC, Fabrino DL, D'Avila H, Teixeira HC, Ferreira AP. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. *Cell Biol Int* 2003; 27(10):853-861.

Melo RCN, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem* 2011 Feb;59(5):540-556.

Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol and Therapeut* 2006; 110(3): 371- 385.

Moreira LO, Zamboni DS. Nod1 and Nod2 signaling in infection and inflammation. *Front Immunol* 2012; 3(328): 1-12.

Moreira LS, Piva B, Gentile LB, Santos FPM, D'Avila H, Monteiro CMM, Bozza PT, Melo CB, Diaz BL. Cytosolic phospholipase A₂-driven PGE₂ synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2009; 1791: 156-165.

Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 2001; 40:325–438.

Nish S, Medzhitov R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity* 2011; 34: 629-636.

O'Neill LA. How toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(1):3-9.

Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 2002; 169(11):6498-6506.

Park JH, Kim YG, McDonald C, Kanneganti TD, Hasegawa M, Body-Malapel M, Inohara N, Nuñez G. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2380-6.

Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 8067-8072.

Plotkowski MC, Brandão BA, Assis MC, Feliciano LFP, Raymond B, Freitas C, Saliba AM, Zahm JM, Touqui L, Bozza PT. Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. *Microbial Pathol* 2008; 45: 30-37.

Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 2012; 13(4): 333-342.

Ratner AJ, Aguilar JL, Shchepetov M, Lysenko ES, Weiser JN. Nod1 mediates cytoplasmic sensing of combinations of extracellular bacteria. *Cell Microbiol* 2007; 9:1343-1351.

Roingard P. La gouttelette lipidique. Un nouvel organite? *Med/Sci* 2013; 29: 495-500.

Russel DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophage and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 2009; 10(9): 943-948.

Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 2009; 10(9):943-8.

Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, Akira S. Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2011; 34(3):352-63.

Silva AR, Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Maya-Monteiro CM, D'Alegria B, Magalhães KG, de Assis EF, Bandeira-Melo C, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(11):1066-75.

Singh R, Cuervo AM. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol* 2012; 1-12.

Smith DE. The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. *J Leuk Biol* 2011; 89: 1-10.

Sorgi CA, Secatto A, Fontanari C, Turato WM, Belangér C, Ivo de Medeiros A, Kashima S, Marleau S, Covas DT, Bozza PT, Faccioli LH. *Histoplasma capsulatum* cell wall-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 2009; 182: 4025– 4035.

Takahashi Y, Isuzugawa K, Murase Y, Imai M, Yamamoto S, Iizuka M, Akira S, Bahr GM, Momotani E, Hori M, Ozaki H, Imakawa K. Up-regulation of Nod1 and Nod2 through TLR4 and TNF α in LPS-treated murine macrophages. *J Vet Med Sci* 2006; 68(5):471-478.

Tekippe ME, Allen IC, Hulseberg PD, Sullivan JT, McCann JR, Sandor M, Braunstein M, Ting JP. Granuloma formation and host defense in chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection requires PYCARD/ASC but not NLRP3 or caspase-1. *PLoS One*. 2010; 5(8):e12320.

Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhães JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nuñez G, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010; 11(1): 55-62.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 179-190.

Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*. 2009; 6(1):10-21.

von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, van Rooijen N, Brown CR, Krantz BA, Leppla SH, Gronert K, Vance RE. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome *in vivo*. *Nat* 2012; 490(7418): 107-111.

von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarría-Smith J, Vance RE. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 73-106.

Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, Castillo R, Bourquin C, Guarda G, Tian Z, Tschopp J, Zhou R. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 2013; 38(6): 1154-1163.

Yang Y, Yin C, Pandey A, Abbott D, Sasseti C, Kelliher MA. Nod2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *J Biol Chem* 2007; 282(50): 36223–36229.

Yang Y, Zhou X, Kouadir M, Shi F, Ding T, Liu C, Liu J, Wang M, Yang L, Yin X, Zhao D. The AIM2 inflammasome is involved in macrophage activation during infection with virulent Mycobacterium bovis strain. *J Infect Dis* 2013; 208(11): 1849-1858.

Yoo NJ, Park WS, Kim SY, Reed JC, Son SG, Lee JY, Lee SH. Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1beta processing through the interaction with pro-caspase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(4):652-8.

Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 2007; 21:167–178.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24: 677-688.