

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Rhanoica Oliveira Guerra

Avaliação da participação de diferentes inflamassomas no reconhecimento e  
no controle da infecção experimental por *Legionella longbeachae*

Ribeirão Preto

2024

Rhanoica Oliveira Guerra

Avaliação da participação de diferentes inflamassomas no reconhecimento e no controle da infecção experimental por *Legionella longbeachae*

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Coorientadora: Dra. Danielle Pini Alves Mascarenhas

Ribeirão Preto

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Guerra, Rhanoica Oliveira

Avaliação da participação de diferentes inflamassomas no reconhecimento e no controle da infecção experimental por *Legionella longbeachae*, 2024. 79 p.

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

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Coorientadora: Dra. Danielle Pini Alves Mascarenhas

1. *Legionella longbeachae*; 2. Inflamassomas; 3. Caspase-11; 4. GSDMD;
5. Caspase-8; 6. Controle da replicação.

Rhanoica Oliveira Guerra

Avaliação da participação de diferentes inflamassomas no reconhecimento e no controle da infecção experimental por *Legionella longbeachae*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

---

Dr. Djalma de Souza Lima Júnior

NIH Campus

---

Prof. Dr. Joao Gustavo Pessini Amarante-Mendes

Universidade de São Paulo

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida e por me dar forças durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador, prof. Dr. Dario Zamboni, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pela confiança, por todos os ensinamentos, pela orientação e incentivos. Obrigada por cada discussão científica, as quais me permitiram desenvolver um pensamento crítico.

À minha coorientadora, Dra. Danielle Mascarenhas, que desempenhou um papel crucial no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por me ensinar tanto, pelos conselhos e parceria durante todo o mestrado.

Aos meus pais, Marcos César e Gilsilene, esse trabalho de mestrado representa não apenas um marco profissional, mas também é um testemunho do apoio, incentivo e amor que tenho recebido ao longo da jornada. Obrigado por serem os melhores pais e modelos de dedicação.

À minha irmã, Rhanaira, pelo apoio emocional e por ser tão presente em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelos seus conselhos tão sábios e por sempre acreditar no meu potencial. Você é uma irmã incrível.

Aos meus queridos irmãos de igreja, em especial a Lara e a Eloísa, que, em uma cidade desconhecida, me receberam com tanto carinho, tornando-se a minha segunda família. Agradeço por cada ensinamento, oração e momento de comunhão que compartilhamos.

Às minhas amigas Priscila Ellias e Hellen Anastásia, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim.

Às amigadas que tive a oportunidade de construir no laboratório, expresse minha profunda gratidão. A Isadora Mafra, Amanda Becerra, Juliana Madeira, Amanda Seribelli, Patrícia Cacua e Tamara, agradeço por cada momento compartilhado, pelas risadas que aliviaram as tensões, pelo apoio mútuo que fortaleceu nossos laços e por serem fontes constantes de incentivo. Vocês tornaram essa jornada mais leve, prazerosa e repleta de significado.

Aos demais colegas/amigos do laboratório, Marco Ataide, Letícia Almeida, Keise, Adriene, Felipe, Pedro, Moisés, e Juliane, pela colaboração, pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração. Foi uma verdadeira honra estar ao lado de pessoas tão dedicadas e talentosas.

À Maira, Amanda Zuin, Josiane e Patrícia Vendruscolo pelo valioso suporte técnico. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos técnicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial a Maria Helena, que direta ou indiretamente contribuíram para desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do programa de Imunologia Básica e Aplicada, que se mostraram comprometidos com a qualidade e excelência do ensino.

À Ana Cristine, secretária da pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, por toda paciência, dedicação, incentivo e disponibilidade em ajudar os alunos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e pelas considerações para melhoria desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

## RESUMO

GUERRA, R. O. **Avaliação da participação de diferentes inflamassomas no reconhecimento e no controle da infecção experimental por *Legionella longbeachae***. 2024. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

As bactérias Gram-negativas, *Legionella longbeachae* e *Legionella pneumophila*, podem infectar o homem e causar a doença dos legionários, caracterizada por uma pneumonia grave e, em alguns casos, fatal. Embora as manifestações clínicas das infecções por essas duas bactérias sejam semelhantes, observa-se que *L. longbeachae* é significativamente mais virulenta e imunologicamente mais silenciosa em murinos, quando comparada à *L. pneumophila*. A resposta imune frente à infecção por *L. pneumophila* é bem caracterizada, diferentemente da resposta contra à infecção por *L. longbeachae*. Um dos mecanismos de defesa do hospedeiro para restringir a replicação bacteriana é a ativação dos inflamassomas, os quais são complexos proteicos multiméricos formados no citosol de células da imunidade inata. Essa ativação desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-18), bem como a morte piroptótica a partir da clivagem de Gasdermina-D (GSDMD). Tem sido demonstrado que *L. pneumophila* consegue ativar os inflamassomas de NLRP3, AIM2 e, principalmente, NAIP5/NLRC4, após o reconhecimento de LPS e efluxo de K<sup>+</sup>, dsDNA e flagelina, respectivamente. No entanto, *L. longbeachae* consegue evadir da ativação do inflamassoma de NAIP5/NLRC4 por não codificar a flagelina. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi investigar a ativação dos inflamassomas e sua importância no controle bacteriano durante a infecção por *L. longbeachae* *in vivo* e *in vitro*. Assim, observamos que *L. longbeachae* ativa os inflamassomas de AIM2 e, sobretudo, de NLRP3 pela via não canônica em macrófagos. No entanto, notamos que as Caspase-1 e -11 são dispensáveis para o controle bacteriano tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Por outro lado, identificamos uma via crítica para o controle *in vivo* de *L. longbeachae*, dependente de GSDMD e da Caspase-8. Nossos resultados fornecem uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos pelos quais medeiam a eliminação da *L. longbeachae*.

Palavras-chaves: *Legionella longbeachae*; Inflamassomas; Caspase-11; GSDMD; Caspase-8; Controle da replicação.



## ABSTRACT

GUERRA, R. O. **The role of different inflammasomes in the recognition and control of experimental infection by *Legionella longbeachae***. 2024. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

The Gram-negative bacteria *Legionella longbeachae* and *Legionella pneumophila* can infect humans and cause Legionnaires' disease, characterized by severe and, in some cases, fatal pneumonia. Although the clinical manifestations of infections by these two bacteria are similar, it has been observed that *L. longbeachae* is significantly more virulent and immunologically more silent in murines when compared to *L. pneumophila*. The immune response to infection by *L. pneumophila* is well characterized, unlike the response to infection by *L. longbeachae*. One of the host's defense mechanisms to restrict bacterial replication is the activation of inflammasomes, which are multimeric protein complexes formed in the cytosol of innate immunity cells. This activation triggers the release of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-18), as well as pyroptotic death from the cleavage of Gasdermin-D (GSDMD). It has been shown that *L. pneumophila* can activate the NLRP3, AIM2 and, especially, NAIP5/NLRC4 inflammasomes, following LPS recognition and efflux of K<sup>+</sup>, dsDNA and flagellin, respectively. However, *L. longbeachae* evades NAIP5/NLRC4 inflammasome activation because it does not encode flagellin. The aim of this study was to investigate the activation of inflammasomes and their importance in bacterial control during infection by *L. longbeachae* *in vivo* and *in vitro*. Thus, we observed that *L. longbeachae* activates the AIM2 and, above all, NLRP3 inflammasomes via the non-canonical pathway in macrophages. However, we note that Caspase-1 and -11 are dispensable for bacterial control both *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, we identified a critical pathway for the *in vivo* control of *L. longbeachae*, dependent on GSDMD and Caspase-8. Our results provide a better understanding of the immunological mechanisms by which they mediate the elimination of *L. longbeachae*.

Keywords: *Legionella longbeachae*; Inflammasomes; Caspase-11; GSDMD; Caspase-8; Control of replication.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Arquitetura e montagem do inflamassoma de mamíferos.....	26
Figura 2 - <i>L. longbeachae</i> induz a clivagem da GSDMD e uma secreção reduzida de IL-1 $\beta$ quando comparada à <i>flaA</i> <sup>-</sup> <i>Lpn</i> em macrófagos. ....	40
Figura 3 - <i>L. longbeachae</i> desencadeia a ativação do inflamassoma não-canônico de NLRP3 em macrófagos. ....	43
Figura 4 - <i>L. longbeachae</i> ativa os inflamassomas de NLRP3 e AIM2 em macrófagos. ....	45
Figura 5 - Caspase-1, Caspase-11, AIM2 e GSDMD são dispensáveis para o controle de <i>L. longbeachae</i> em macrófagos. ....	47
Figura 6 - GSDMD e NLRP3 são importantes para o controle de <i>L. longbeachae in vivo</i> . ....	50
Figura 7 - A deficiência das vias de inflamassomas gera mais danos no pulmão durante a infecção por <i>L. longbeachae</i> . ....	51
Figura 8 - Caspase-8 é importante no controle bacteriano <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . ....	54
Figura 9 - Modelo proposto de mecanismos da resposta imunológica durante à infecção por <i>L. longbeachae</i> . ....	62

## ABREVIATURAS

AIM2: do inglês, *Absent in Melanoma 2*

AP1: do inglês, *Activator Protein 1*

ASC: do inglês *Apoptosis-Associated Speck-Like Protein*

ATP: do inglês, *Adenosine Triphosphate*

BAL: Lavado Broncoalveolar

BIR: Repetições Inibidoras de Baculovírus, do inglês, *Baculovirus Inhibitor Repeats*

BMDCs: Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea

BMDMs: Macrófagos Derivados de Medula Óssea

CAPS: Síndromes Periódicas Associadas à Criopirina

CARD: do inglês, *Caspase Recruitment Domain*

CETEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

cGAS: do inglês, *cyclic GMP-AMP Synthase*

CLRs: Receptores de Lectina tipo-C

CONCEA: Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal

CYE: Ágar-carvão com extrato de levedura

DAPI: do inglês, 4',6-diamidino-2-phenylindole

DED: Domínio de Morte, do inglês, *Death Effector Domain*

dsDNA: DNA de dupla fita

ELISA: do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GSDMD: Gasdermina-D

HMGB1: do inglês, *High-Mobility Group Box 1*

hNAIP: do inglês, NAIP *human*

IFN: Interferons do tipo 1

IL1R: Receptor de Interleucina-1

IRF: do inglês, *Interferon-Regulatory Factor*

*L. long dotB*<sup>-</sup>: *Legionella longbeachae* mutante para o gene *dotB*<sup>-</sup>

*L. long*: *Legionella longbeachae*

LCCM: do inglês, *L Cell Conditioned Medium*

LCV: do inglês *Legionella-Containing Vacuole*

LDH: Lactato Desidrogenase

*flaA<sup>-</sup> Lpn*: cepa *L. pneumophila* JR32 deficiente em flagelina

LPS: Lipopolissacarídeo

LRRs: Repetições Ricas em Leucinas

MAPK: MAP quinase

moDCs: Células Dendríticas Derivadas de Monócitos

MOI: Multiplicidade de Infecção

MyD88: do inglês, *Myeloid Differentiation Factor 88*

NAIP: *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing protein family of apoptosis inhibitory protein*

NF- $\kappa$ B: do inglês, *Nuclear Factor- $\kappa$ B*

NINJ-1: Ninjurina-1

NK: Células Natural Killer

NLRs: *Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing protein family of apoptosis inhibitory protein (Nod-like Receptor)*

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos, inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*

PBS: do inglês, *phosphate-buffered saline*

PFD: Domínio Terminal Formador de Poros, do inglês *N-terminal pore-forming domain*)

PI: Iodeto de Propídio

PITs: do inglês, *Pore-Induced Intracellular Trap*

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrão

*PYD*: Domínio Pirina, do inglês *Pyrin Domain*

RD: Domínio Repressor C-terminal, do inglês, *C-terminal repressor domain*

RLRs: Receptores RIG-like

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês, *Reactive oxygen species*

SBF: Soro Bovino Fetal

T3SS: Sistema de Secreção Tipo III

T4SS: Sistema De Secreção Tipo IV

TIR: Domínio Citoplasmático Toll/Interleucina-1

TIRAP: do inglês, *TIR domain-containing adaptor protein*

TLRs: Receptores Toll-like

TRAM: do inglês, *TRIF-Related Adaptor Molecule*

TRIF: do inglês, *TIR Domain-Containing Adaptor Inducing Interferon-B*

UFC: Unidade Formadora de Colônia, do inglês, *Colony-Forming Unit*

WB: *Western Blotting*

## SUMÁRIO

1.	Introdução	16
1.1	<i>Legionella</i> spp.	16
1.2	Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR)	18
1.2.1	Receptores Toll-like (TLRs) e <i>L. pneumophila</i>	19
1.2.2	Receptores NOD-like (NLRs) e <i>L. pneumophila</i>	21
1.3	Inflamassomas	22
1.3.1	Ativação dos inflamassomas durante a infecção por <i>L. pneumophila</i>	27
1.4	Resposta imunológica durante a infecção por <i>L. longbeachae</i>	29
2.	Objetivos	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3.	Metodologia	32
3.1	Animais	32
3.2	Cultura e preparo de bactérias	32
3.3	Obtenção e infecção de macrófagos derivados de medula óssea	33
3.4	Infecções <i>in vivo</i> e coleta do Lavado Broncoalveolar (BAL)	33
3.5	Ensaio de liberação de LDH	34
3.6	Dosagem de IL-1 $\beta$ e IL-1 $\alpha$ por ELISA	34
3.7	Ensaio de replicação <i>in vitro</i>	34
3.8	Western Blotting	35
3.9	Ensaio de imunofluorescência	36
3.10	Ativação de Caspase-8	36
3.11	Ensaio de formação de poros	36
3.12	Ensaio de mortalidade	37
3.13	Análises Estatísticas	37

4.	Resultados	38
4.1	<i>L. longbeachae</i> induz a clivagem da GSDMD e uma secreção reduzida de IL-1 $\beta$ quando comparada à <i>flaA</i> <sup>-</sup> <i>Lpn</i> em macrófagos	38
4.2	<i>L. longbeachae</i> desencadeia a ativação do inflamassoma não-canônico de NLRP3 em macrófagos	41
4.3	<i>L. longbeachae</i> ativa os inflamassomas de NLRP3 e AIM2 em macrófagos	44
4.4	Caspase-1, Caspase-11, AIM2 e GSDMD são dispensáveis para o controle de <i>L. longbeachae</i> em macrófagos	46
4.5	GSDMD e NLRP3 são importantes para o controle de <i>L. longbeachae</i> <i>in vivo</i>	48
4.6	Caspase-8 é importante no controle bacteriano <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	52
5.	Discussão	56
6.	Conclusões	62
	Referências	64
	ANEXO	77

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Legionella* spp.

As espécies de *Legionella* são bactérias Gram-negativas encontradas em ambientes aquáticos e solo úmido (MONDINO et al., 2020). A primeira espécie identificada foi *L. pneumophila* em 1976 (FRASER et al., 1977), e atualmente o gênero abrange mais de 65 espécies conhecidas, sendo que mais da metade delas é responsável por causar doenças em humanos (MIYASHITA et al., 2020). *L. pneumophila* destaca-se como a principal espécie isolada em casos clínicos em todo o mundo, especialmente na Europa e nos Estados Unidos (MONDINO et al., 2020; PHIN et al., 2014; YU et al., 2002). *L. longbeachae*, por sua vez, identificada pela primeira vez em 1980, tem baixa prevalência global. Contudo, é o principal agente etiológico dos casos no Hemisfério Sul, particularmente na Austrália e Nova Zelândia, onde o diagnóstico é realizado como rotina (Currie & Beattie, 2015; Montanaro-Punzengruber et al., 1999). Além disso, estudos apontam que a infecção por *L. longbeachae* tem aumentado na Europa e em partes da Ásia (WHILEY; BENTHAM, 2011). A identificação e a notificação de infecções causadas por outras espécies além da *L. pneumophila* são desafiadas pela falta de técnicas de diagnóstico sensíveis e amplamente disponíveis (MURDOCH, 2003).

As infecções por *Legionella* spp. podem ser assintomáticas ou sintomáticas. Os casos sintomáticos são caracterizados por duas manifestações clínicas distintas (CURRIE; BEATTIE, 2015). A Doença dos Legionários é definida por uma pneumonia grave com sintomas de febre, tosse, calafrios, dispneia, mialgia ou artralgia, manifestações gastrointestinais e neurológicas, entre outros. O período de incubação é de aproximadamente 2 a 14 dias e a taxa de mortalidade é mais alta em pacientes imunossuprimidos (CUNHA; BURILLO; BOUZA, 2016). Além disso, a incidência é maior em indivíduos com fatores de risco predisponentes, como tabagismo, doença cardiovascular ou respiratória crônica, diabetes, abuso de álcool e imunossupressão (PHIN et al., 2014). Por outro lado, a Febre de Pontiac é uma doença febril e autolimitante, semelhante à gripe, com período de incubação curto de um a dois dias (KAUFMANN et al., 1981; MIYASHITA et al., 2020). Dessa forma, os sintomas mais comuns são febre, calafrios, mialgia, mal-estar e cefaleia (GLICK et al., 1978).



*L. pneumophila* tem uma ampla distribuição em ambientes aquáticos, tanto naturais quanto artificiais, que vão desde lagos e riachos até torres de resfriamento de sistemas de ar-condicionado, fontes e banheiras de hidromassagem (BORELLA et al., 2005; KOIDE et al., 1993; NEWTON et al., 2010). Nessas localidades, a bactéria prolifera em biofilmes e estabelece interações parasitárias ou comensais com protozoários aquáticos, como as amebas de vida livre, incluindo *Acanthamoeba* e *Naegleria* (BORELLA et al., 2005; NISAR et al., 2022; SCHWAKE; ALUM; ABBASZADEGAN, 2021). Como resultado, a transmissão para o homem ocorre através da inalação ou aspiração de aerossóis ou água contaminada por *L. pneumophila* (NEWTON et al., 2010). Em contrapartida, *L. longbeachae* reside no solo, onde presumivelmente também está associada a protozoários (MONDINO et al., 2020; STEELE; MCLENNAN, 1996). Essa bactéria exibe uma notável adaptação ao solo, evidenciada pela codificação de proteínas que facilitam a invasão e a degradação de material vegetal (CAZALET et al., 2010; WHILEY; BENTHAM, 2011). Embora a transmissão para o homem não esteja totalmente esclarecida, acredita-se que aconteça devido ao manuseio de solos em vasos ou jardins, resultando na inalação de poeira proveniente de solos contaminados (MONDINO et al., 2020). A incidência mais elevada de casos de infecção por *L. longbeachae* na Austrália e na Nova Zelândia, por exemplo, pode ser atribuída à composição das misturas de vasos, as quais incluem cascas de pinheiros e serragem compostada (CHAMBERS et al., 2021; RUEHLEMANN; CRAWFORD, 1996). Algumas medidas preventivas são recomendadas para evitar a infecção por *L. longbeachae* e incluem: uso de máscara facial, evitar a inalação de poeira e aerossóis e lavar as mãos após o uso das misturas para vasos (WHILEY; BENTHAM, 2011).

Após a inalação de aerossóis contaminados por *Legionella* spp., a bactéria é fagocitada por macrófagos alveolares e neutrófilos. No interior dessas células, a *Legionella* spp. reside em um compartimento isolado da via endossômica e envolto pelo retículo endoplasmático, chamado LCV (do inglês, *Legionella-Containing Vacuole*) (COPENHAVER et al., 2014; NEWTON et al., 2010). Essa estratégia permite à bactéria evitar a degradação fagolisossomal, bem como as defesas intracelulares. Além disso, possibilita a aquisição de nutrientes necessários para a sua replicação (MONDINO et al., 2020). A formação desse compartimento é dependente do sistema de secreção tipo IV (T4SS), codificado pelos genes *Dot/Icm*, que possibilita a

translocação de proteínas efetoras que coordenam todas as etapas da vida intracelular da *Legionella* spp. (MONDINO et al., 2020). Uma análise genômica comparativa entre as bactérias *L. pneumophila* e *L. longbeachae* revelou que apenas 44% dos substratos codificados pelos genes Dot/icm são conservados entre as espécies, o que sugere que, além das diferenças no nicho ambiental, existem variações genéticas que podem resultar em uma fisiopatogênese diferencial (CAZALET et al., 2010; CHAMBERS et al., 2021).

O ciclo de vida da *L. pneumophila* e da *L. longbeachae* é bifásico, caracterizado por uma forma replicativa (avirulenta) em condições ricas de nutrientes, favorecendo sua replicação; e outra forma transmissiva (virulenta) quando a densidade bacteriana aumenta e os nutrientes tornam-se limitados, o que induz a expressão de seus fatores de transmissão para escapar da célula hospedeira e invadir um novo hospedeiro (MONDINO et al., 2020). De forma interessante, uma análise transcriptômica revelou que as mudanças no programa de expressão gênica durante essas fases são menos acentuadas para *L. longbeachae*. Esse dado pode oferecer uma explicação para a capacidade infecciosa da *L. longbeachae*, que parece ser independente de sua fase de crescimento (CAZALET et al., 2010; MONDINO et al., 2020).

Em resposta à infecção por *L. pneumophila*, o organismo humano é capaz de controlá-la por meio de uma resposta inflamatória robusta e uma eficiente imunidade mediada por células. Nesse contexto, a bactéria inicialmente induz a ativação da resposta imunológica por meio do reconhecimento pelos Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) (LIU; SHIN, 2019; PARK et al., 2017). Como resultado, são desencadeadas cascatas de sinalização intracelular que resultam em alterações na expressão gênica relacionada às respostas imunes inatas e à ativação da imunidade adaptativa (HARTL et al., 2018). Por outro lado, a resposta imunológica contra à infecção por *L. longbeachae* não é amplamente investigada.

## 1.2 Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR)

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro e é constituída por células que reconhecem os microrganismos a partir de um número limitado de PRRs codificados pela linhagem germinativa. Além de reconhecerem estruturas conservadas entre espécies microbianas, conhecidas como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-associated molecular*

*patterns*), detectam moléculas endógenas liberadas de células danificadas, denominadas Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs, do inglês, *Damage-associated molecular patterns*). Atualmente, existem cinco classes de famílias de PRRs, que são: os receptores de membrana plasmática, como os receptores Toll-like (TLRs) e os receptores de lectina tipo C (CLRs); e os citoplasmáticos, como os receptores RIG-like (RLRs), os Receptores NOD-like (NLRs) e os sensores de DNA citosólicos, tais como o cGAS (do inglês, *cyclic GMP-AMP synthase*) e AIM2 (do inglês, *absent in melanoma 2*) (BRIARD; PLACE; KANNEGANTI, 2020; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

### 1.2.1 Receptores Toll-like (TLRs) e *L. pneumophila*

Os TLRs são os PRRs mais bem caracterizados e são glicoproteínas do tipo I de membrana, caracterizados por um domínio com repetições ricas em leucinas (LRRs) de reconhecimento do ligante na região N-terminal e um domínio citoplasmático Toll/Interleucina-1 (TIR) importante para a sinalização à jusante. Em humanos, foram identificados 10 membros da família TLRs e 12 em camundongos. Esses sensores podem estar localizados na membrana plasmática, como o TLR1, 2, 4, 5 e 6, ou nos endossomos, como TLR3, 7, 8 e 9. Cada TLR possui especificidades para diferentes PAMPs. De maneira geral, os TLRs na superfície celular se ligam a lipídeos, proteínas e lipoproteínas da membrana de microrganismos, enquanto os TLRs endossomais reconhecem ácidos nucleicos microbianos e seus derivados (ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, 2021; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

A interação dos TLRs com seus ligantes desencadeia alterações conformacionais no receptor e o recrutamento de proteínas adaptadoras que contém o domínio TIR, como MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation factor 88*), TRIF (do inglês, *TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$* ), TIRAP (do inglês, *TIR domain-containing adaptor protein*) e TRAM (do inglês, *TRIF-related adaptor molecule*). Consequentemente, diferentes fatores de transcrição são ativados, incluindo NF- $\kappa$ B (do inglês, *nuclear factor  $\kappa$ B*), AP1 (do inglês, *Activator protein 1*) e IRF (do inglês, *interferon-regulatory factor*). Essas vias de sinalização resultam na produção de interferons tipo 1 (IFN), citocinas pró-inflamatórias, bem como na

liberação de quimiocinas (KAWAI; AKIRA, 2010; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Os diversos componentes estruturais da *L. pneumophila* interagem com os TLRs e têm sido alvo de extensivas investigações. Já foi observado que a lipoproteína associada ao peptidoglicano de membrana, bem como ao lipopolissacarídeo (LPS) interagem com TLR2 (HO et al., 2009). Além disso, na ausência de TLR2, houve maior taxa de mortalidade e maior suscetibilidade à infecção (ARCHER; ROY, 2006; FUSE et al., 2007; HAWN et al., 2006; MASCARENHAS et al., 2015). A sinalização mediada por TLR2 em modelos murinos desempenha um papel crucial na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e a proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2), contribuindo para o recrutamento de leucócitos, especialmente os neutrófilos (FUSE et al., 2007). De forma interessante, os estudos indicam que o reconhecimento do LPS bacteriano pelo TLR4 não é crucial para a depuração bacteriana em modelo murino, embora pareça desempenhar um papel importante no reconhecimento e na resposta por macrófagos humanos contra *L. pneumophila* (ARCHER; ROY, 2006; FUSE et al., 2007; GRIGORYEVA; CIANCIOTTO, 2021; LETTINGA et al., 2002; MASCARENHAS et al., 2015).

A suscetibilidade humana à Doença dos Legionários já foi associada a um polimorfismo de códon de parada dominante comum no gene que codifica o TLR5, o que resulta no comprometimento da produção de citocinas pró-inflamatórias nas células epiteliais após o reconhecimento da flagelina bacteriana (HAWN et al., 2003). Em murinos, o TLR5 regula o recrutamento precoce de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelos macrófagos alveolares após a infecção por *L. pneumophila* (HAWN et al., 2007). No entanto, a ausência de TLR5 em camundongos não resultou em um aumento na carga bacteriana quando comparada aos animais selvagens (ARCHER et al., 2009; HAWN et al., 2007).

Além disso, o TLR9, que reconhece DNA bacteriano, é necessário para uma resposta ideal contra *L. pneumophila* (BHAN et al., 2008; MASCARENHAS et al., 2015; NEWTON et al., 2007). Isso porque animais *Tlr9*<sup>-/-</sup> apresentaram maior suscetibilidade à infecção; tal condição é observada pelo aumento da mortalidade e aumento da carga bacteriana. A falha no controle foi associada à redução de células

dendríticas mieloides e células T CD4<sup>+</sup> no pulmão, bem como à ativação clássica prejudicada dos macrófagos (BHAN et al., 2008).

De maneira intrigante, os animais com deficiência em MyD88 demonstram uma maior suscetibilidade à infecção por *L. pneumophila* em comparação com aqueles que apresentam deficiência em um dos TLRs ou em TLR2/TLR9 e TLR2/TLR5 (ARCHER et al., 2009; MASCARENHAS et al., 2015). Tanto a produção de IFN- $\gamma$  por células Natural Killer (NK) quanto o recrutamento eficaz de neutrófilos para os pulmões através da sinalização receptor de interleucina-1 (IL1R), são dependentes de MyD88 e fornecem uma explicação parcial para o aumento da suscetibilidade dos animais *Myd88*<sup>-/-</sup> (ARCHER et al., 2009; MASCARENHAS et al., 2015). Contudo, são necessários mais estudos para avaliar se outros TLRs ou receptores distintos dos TLRs, que dependem de MyD88, desempenham um papel crítico no controle de *L. pneumophila*.

#### 1.2.2 Receptores NOD-like (NLRs) e *L. pneumophila*

A família dos NLRs é constituída por 23 membros em humanos e 34 em murinos, sendo responsável pelo reconhecimento de ligantes presentes no citoplasma das células (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Esses receptores são constituídos por três domínios: 1) domínio C-terminal rico em leucinas (LRRs), responsável por reconhecer os PAMPs e DAMPs; 2) domínio NOD, que permite a auto-oligomerização dos receptores de maneira dependente de ATP; 3) domínio efetor N-terminal, que permite as interações homotípicas com proteínas de sinalização, e inclui os domínios efetores de morte (DED, do inglês, *Death Effector Domain*), Pirina (PYD, do inglês *Pyrin Domain*), recrutamento de caspases (CARD, do inglês *Caspase Recruitment Domain*) e repetições inibidoras de baculovírus (BIR, do inglês, *Baculovirus Inhibitor Repeats*) (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Conforme as variações na região N-terminal, os NLRs são subdivididos em cinco grupos, sendo os conjuntos NLRC e NLRP os mais bem caracterizados (PLATNICH; MURUVE, 2019). Os NLRC incluem membros com um ou mais domínios CARD e consistem em cinco proteínas (NLRC1-5). Por outro lado, os NLRP possuem domínios PYD e abrange aproximadamente 14 membros em humanos (BACCALA et al., 2009).

Os receptores NOD1 (ou NLRC1) e NOD2 (ou NLRC2), os quais reconhecem derivados de peptidoglicanos bacterianos, exercem papel parcial no controle da

infecção por *L. pneumophila* (BERRINGTON et al., 2010; FRUTUOSO et al., 2010). Isso porque cooperam para o recrutamento de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção (BERRINGTON et al., 2010; FRUTUOSO et al., 2010). Dessa forma, a sinalização por NOD1 e NOD2 resulta na ativação NF- $\kappa$ B e MAPK por meio de um adaptador RIP2 e, conseqüentemente, leva à regulação transcricional de genes relacionados à inflamação (INOHARA et al., 2005; PLATNICH; MURUVE, 2019; SHIN et al., 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Além disso, alguns NLRs, como NLRC4 e NLRP3, são reconhecidos por formar um complexo proteico denominado inflamassoma, o qual é essencial para o controle de *L. pneumophila* (MASCARENHAS; ZAMBONI, 2017; PLATNICH; MURUVE, 2019), conforme discutido a seguir.

### 1.3 Inflamassomas

Os inflamassomas são complexos multiproteicos formados no citosol das células de mamíferos após a detecção de patógenos ou sinais de dano, desencadeando inflamação e morte celular. Embora a biologia dos inflamassomas seja mais bem descrita em macrófagos, outras células mieloides, como neutrófilos e células dendríticas, também apresentam esse mecanismo de resposta (PANDEY et al., 2021; XUE et al., 2019). A identidade dos inflamassomas depende dos sensores que são ativados e são subdivididos em canônicos, os quais levam à ativação de Caspase-1, incluindo os inflamassomas AIM2, NAIP-NLRC4, NLRP3 e de Pirina; e os não-canônicos, que ocorre de forma dependente de outras caspases, como as Caspase-4 e -5 (em humanos) ou Caspase-11 (em camundongos), o que resulta na ativação não-canônica do inflamassoma de NLRP3 (PLATNICH; MURUVE, 2019; XUE et al., 2019).

As caspases são uma família de cisteína proteases e desempenham um papel central na morte celular e resposta inflamatória (VAN OPDENBOSCH; LAMKANFI, 2019). Essas enzimas clivam seus substratos na região carbono-terminal do aspartato e são inicialmente expressas nas células como zimogênios inativos, também conhecidas como pró-caspases (JULIEN; WELLS, 2017; VAN OPDENBOSCH; LAMKANFI, 2019). As pró-caspases geralmente consistem em um domínio pró-amino-terminal e duas subunidades catalíticas na região carbono-terminal, uma grande e outra pequena. As regiões N-terminais possuem um domínio CARD ou DED,

importantes para o recrutamento e ativação das caspases em complexos multiproteicos (VAN OPDENBOSCH; LAMKANFI, 2019). A ativação das caspases ocorre após a dimerização e clivagem do pró-domínio e do ligante intersubunidade (JULIEN; WELLS, 2017). Com base na função biológica e similaridade de sequências, as caspases podem ser classificadas em: inflamatórias, incluindo as Caspase-1, -4 e -5 (-11 em camundongos); e apoptóticas, subdivididas em iniciadoras (Caspase-8, -9 e -10) e executoras (Caspase-3, -6 e -7) (CREAGH, 2014; JULIEN; WELLS, 2017). Apesar da Caspase-7 e a Caspase-8 serem classificadas como apoptóticas, também podem desempenhar um papel durante a ativação dos inflamassomas (GONÇALVES et al., 2019; MASCARENHAS et al., 2017; ROSS et al., 2022).

Durante a ativação dos inflamassomas canônicos, além do recrutamento das caspases, pode ocorrer ou não o recrutamento de uma proteína adaptadora, chamada ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein*) (PANDEY et al., 2021; XUE et al., 2019). Essa proteína possui um domínio PYD, que interage com os PRRs, e um domínio CARD, que se liga à pró-caspase-1 por meio de interações homotípicas (Figura 1) (PLATNICH; MURUVE, 2019; SHARMA; KANNEGANTI, 2016). Por consequência, pontos discretos, também chamados “puncta” ou “specks” podem ser visualizados por microscopia de luz no interior das células (BOUCHER et al., 2018; PLATNICH; MURUVE, 2019). A proximidade de ASC com a pró-caspase-1 promove a clivagem auto proteolítica da Caspase-1 para produzir as subunidades ativas p10 e p20 (BOUCHER et al., 2018; SHARMA; KANNEGANTI, 2016). Em seguida, a Caspase-1 ativada cliva as citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e IL-18, tornando-as biologicamente ativas (KOVACS; MIAO, 2017). Essas citocinas estão envolvidas em diversos efeitos tanto no sistema imune inato quanto adaptativo (PLATNICH; MURUVE, 2019).

Além disso, a ativação da Caspases-1 e -11 também induz uma forma inflamatória e lítica programada de morte celular conhecida como piroptose (BROZ; DIXIT, 2016; GUO; CALLAWAY; TING, 2015). Esse processo depende da Gasdermina-D (GSDMD), que é clivada pelas Caspase-1 e -11 (-4 e -5 em humanos), separando seu domínio N-terminal formador de poros (PFD, do inglês *N-terminal pore-forming domain*) do domínio repressor C-terminal (RD, do inglês, *C-terminal repressor domain*). Como resultado, o PFD liberado se incorpora à membrana celular, onde aproximadamente 16 monômeros de PFD se oligomerizam para formar um poro de

grandes dimensões com diâmetro entre 10 e 15 nm (KOVACS; MIAO, 2017). Os poros de GSDMD são suficientemente amplos para permitir a liberação de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-18, bem como a saída de proteínas solúveis, incluindo lactato desidrogenase (LDH) e HMGB1 (do inglês, *High-Mobility Group Box 1*) (AACHOUI et al., 2013; KOVACS; MIAO, 2017). Simultaneamente, há a dissipação dos gradientes iônicos celulares, levando ao influxo osmótico de água, aumento do inchaço celular e, por fim, a lise da membrana plasmática (AACHOUI et al., 2013). Além da GSDMD, a piroptose depende da proteína de ruptura da membrana plasmática, denominada Ninjurina-1 (NINJ-1) (KAYAGAKI et al., 2021; PANDEY et al., 2021). No entanto, a ativação e os papéis específicos da NINJ-1 na indução da piroptose ainda são pouco compreendidos (DIAS; HORNUNG; NYLANDSTED, 2022).

Dentre os vários tipos de inflamassomas, o NLRP3 é um dos mais amplamente estudados e pode ser ativado por diversos estímulos, como bactérias, fungos, vírus, protozoários, cristais, toxinas formadoras de poros, bem como por DAMPs, ATP e hialuronano, entre outros (BROZ; DIXIT, 2016; LAMKANFI; DIXIT, 2014). Devido à ampla variedade de estímulos que podem ativar esse inflamassoma, acredita-se que exista um evento celular comum desencadeado por todos os seus ativadores. Alguns eventos já foram considerados, incluindo o efluxo de potássio, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e disfunção mitocondrial (BROZ; DIXIT, 2016). Embora desempenhe um papel crucial no controle de microrganismos, sua desregulação já foi associada à patogênese de diversos distúrbios inflamatórios, como síndromes periódicas associadas à criopirina (CAPS), doença de Alzheimer, diabetes, gota, doenças autoinflamatórias e aterosclerose (KELLEY et al., 2019).

No geral, para que haja a ativação dos inflamassomas são necessários dois sinais. O primeiro é chamado de “*priming*” e desencadeia a expressão dos componentes do inflamassoma, pró-caspase-1 e pró-IL-1 $\beta$ , por meio do reconhecimento dos PAMPs e DAMPs pelos PRRs (BROZ; DIXIT, 2016; HE; HARA; NÚÑEZ, 2016). Esse sinal também é importante para induzir as modificações pós-traducionais do NLRP3 para a sua estabilização (MANGAN et al., 2018). O segundo sinal, por sua vez, leva a montagem do inflamassoma. Nesse contexto, os sinais associados à ativação do inflamassoma de NLRP3 inclui: dano oxidativo mitocondrial, ruptura da membrana lisossomal e efluxo de potássio da membrana plasmática (MEYERS; ZHU, 2020). Estudos adicionais destacaram o papel da serina/treonina



quinase NEK7, reguladora do ciclo mitótico, na ativação do inflamassoma NLRP3 (HE et al., 2016; SCHMID-BURGK et al., 2016; SHI et al., 2016). NEK7 interage com o domínio LRR do NLRP3, influenciando a oligomerização de NLRP3, a formação de pontos de ASC e a ativação subsequente da Caspase-1 após o efluxo de potássio (HE et al., 2016; HE; HARA; NÚÑEZ, 2016; SHARMA; KANNEGANTI, 2016; SWANSON; DENG; TING, 2019).

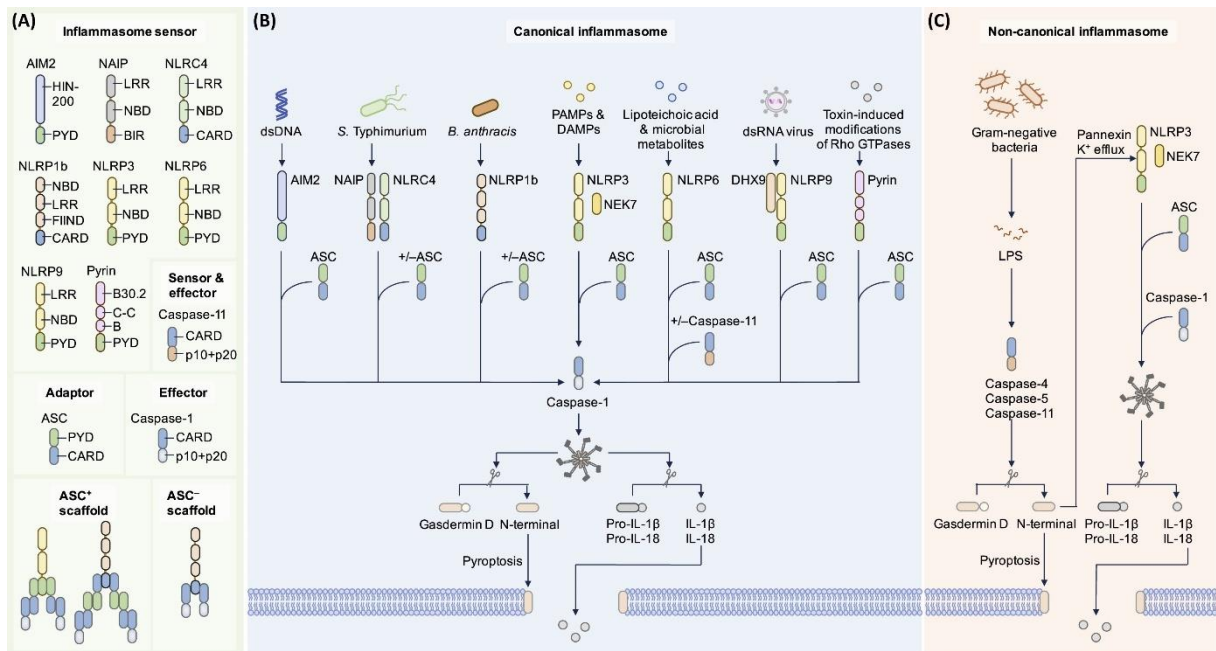
Além da ativação canônica, o inflamassoma de NLRP3 também pode ser desencadeado por meio de uma via não-canônica. Nessa via, a Caspase-11 reconhece o LPS, um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, o que resulta na indução de piroptose por meio da clivagem de GSDMD, de maneira semelhante à ativação pela Caspase-1. Como resultado, ocorre um efluxo de potássio significativo, suficiente para ativar o inflamassoma de NLRP3. É importante ressaltar que, ao contrário da Caspase-1, a Caspase-11 não realiza a clivagem da pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18. Portanto, a liberação das citocinas pró-inflamatórias requer uma ativação secundária de NLRP3, que, por sua vez, recruta a Caspase-1 (DOWNS et al., 2020; MANGAN et al., 2018; SWANSON; DENG; TING, 2019). Em contrapartida, estudos revelaram que tanto a Caspase-11 quanto a Caspase-5 são capazes de clivar IL-1 $\alpha$  (CASSON et al., 2013; CUNHA et al., 2017; WIGGINS et al., 2019).

Outro inflamassoma relevante da família dos NLRs é o NLRC4, ativado mediante o reconhecimento da flagelina bacteriana e proteínas do sistema de secreção tipo III (T3SS) de outras bactérias. Ao invés de reconhecer diretamente seus ativadores, o NLRC4 associa-se às proteínas NAIP (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing protein family of apoptosis inhibitory protein*), as quais interagem com os ligantes e recrutam o NLRC4 (ANDRADE; ZAMBONI, 2020; SHARMA; KANNEGANTI, 2016). Os camundongos possuem sete proteínas NAIP, sendo que NAIP1 e NAIP2 reconhecem as proteínas needle (agulha) e rod (base) do T3SS bacteriano, respectivamente. As proteínas NAIP5 e NAIP6, por sua vez, se ligam à flagelina, a subunidade monomérica do flagelo bacteriano (MASCARENHAS; ZAMBONI, 2017). Até o momento, os ligantes de NAIP3, NAIP4 e NAIP7 permanecem desconhecidos (XUE et al., 2019). Em contrapartida, os seres humanos codificam apenas um NAIP funcional (hNAIP), o qual reconhece as proteínas do T3SS das bactérias e flagelina bacteriana (KORTMANN; BRUBAKER; MONACK, 2015; XUE et al., 2019; YANG et al., 2013). A ativação do NLRC4 pode ocorrer de maneira

independente de ASC, em que o NLRC4 se liga diretamente à Caspase-1 por meio das interações CARD-CARD, ou de forma dependente de ASC, amplificando a ativação da Caspase-1 e o processamento das citocinas inflamatórias (ANDRADE; ZAMBONI, 2020).

Além dos inflamassomas formados pelos membros da família NLRs, ressaltase o inflamassoma de AIM2. O sensor AIM2 é constituído por um domínio PYD N-terminal e um domínio HIN C-terminal, o qual é carregado positivamente e, por isso, interage com a estrutura açúcar-fosfato carregada negativamente do DNA de dupla fita (dsDNA) no citosol das células. Após o reconhecimento do dsDNA, ativa a Caspase-1 de maneira dependente de ASC, o que desencadeia a piroptose e a secreção de citocinas (BROZ; DIXIT, 2016; XUE et al., 2019). Diferentes patógenos são capazes de ativar esse inflamassoma, como citomegalovírus murino e vírus *Vaccinia*; bactérias *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, *Listeria monocytogenes* e *Legionella pneumophila*; o parasita *Plasmodium falciparum*; e o fungo *Aspergillus fumigatus*, entre outros (CUNHA et al., 2017; HAYWARD et al., 2018; XUE et al., 2019). Em contrapartida, a expressão aumentada de AIM2 foi correlacionada à psoríase, ao aneurisma da aorta abdominal e ao lúpus eritematoso sistêmico (BROZ; DIXIT, 2016; WANG et al., 2020).

Figura 1 - Arquitetura e montagem do inflamassoma de mamíferos.



Fonte: Xue et. al (2019). **(A)** Sensores de inflamassoma são proteínas citosólicas que contêm um domínio pirina (PYD) e/ou um domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD). Eles também podem conter um domínio LRR (*leucine-rich-repeat domain*), um domínio NBD (*nucleotide-binding domain*), domínio HIN-200, um domínio B30.2, um domínio C-C (*coiled-coil domain*), um domínio B (B-box), um domínio FIIND (*function-to-find domain*), ou um domínio BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*). Sensores de inflamassoma que contêm um PYD podem recrutar uma proteína adaptadora, chamada ASC (do inglês, *Apoptosis-Associated Speck-Like Protein*) contendo um CARD para mediar as interações CARD-CARD com pró-caspase-1 (representada pelos andaimes positivos para ASC). No entanto, o NLRC4 e o NLRP1b murino contêm um CARD e podem interagir diretamente com a Caspase-1 sem a necessidade de ASC (representado pela estrutura ASC-negativa). **(B)** A ativação do inflamassoma canônico ocorre em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), moléculas de padrões moleculares associados a perigos (DAMPs) e processos moleculares que alteram a homeostase (HAMPs). Os sensores do inflamassoma podem interagir diretamente com seu ligante alvo ou responder a uma variedade de alterações fisiológicas. A Caspase-1 ativada cliva a gasdermina-D (GSDMD) para liberar o domínio N-terminal (GSDMD-NT) que induz a piroptose. A Caspase-1 também cliva a pró-interleucina IL-1 $\beta$  e a pró-IL-18 em suas formas ativas que são liberadas através dos poros do GSDMD. **(C)** O lipopolissacarídeo citosólico (LPS) liberado de bactérias Gram-negativas é detectado pela Caspase-11 murina ou Caspase-4 e -5 humana, levando à ativação do inflamassoma não-canônico. Essas caspases ativadas clivam a GSDMD para induzir a piroptose. Além disso, o GSDMD-NT ativa o inflamassoma NLRP3 que, subsequentemente, induz a maturação de citocinas pró-inflamatórias de maneira semelhante à via canônica do inflamassoma. Abreviaturas: AIM2, *absent in melanoma 2*; *B. anthracis*, *Bacillus anthracis*; DHX9, DEAH-box helicase 9; NAIP, NOD-like receptor family apoptosis inhibitory protein; NEK7, NIMA-related kinase 7; *S. Typhimurium*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

### 1.3.1 Ativação dos inflamassomas durante a infecção por *L. pneumophila*

A ativação dos inflamassomas por *L. pneumophila* tem sido alvo de muitas investigações. Dentre eles, a via do NAIP5/NLRC4 é a mais importante para o controle da replicação bacteriana tanto *in vivo* quanto *in vitro* (GONÇALVES et al., 2019; ZAMBONI et al., 2006a). Inicialmente, pesquisadores observaram que diferentes linhagens de macrófagos, exceto a linhagem A/J, eram resistentes à replicação de *L. pneumophila* (YAMAMOTO et al., 1988). A resistência foi mapeada para um locus autossômico *Lgn1*, o qual codifica NAIP5, um sensor de flagelina capaz de interagir com NLRC4, levando à ativação da Caspase-1 (BECKERS et al., 1995; DIETRICH et al., 1995; DIEZ et al., 2000; ZAMBONI et al., 2006b). Em seguida, a Caspase-1 ativa pode clivar diretamente GSDMD e levar à formação de poros e morte celular ou clivar a Caspase-7, que resulta em uma molécula formadora de poros desconhecida (GONÇALVES et al., 2019).

No entanto, na ausência da Caspase-1 ou GSDMD, o inflamassoma de NAIP5/NLRC4 ativa uma via alternativa que envolve a proteína ASC e a Caspase-8, que, por sua vez, desencadeia a ativação da Caspase-7 e induz a morte celular de forma independente da GSDMD (MASCARENHAS et al., 2017; MIAO et al., 2010; SILVEIRA; ZAMBONI, 2010). Embora esses processos contribuam para limitar a replicação bacteriana, os mecanismos responsáveis pelo controle ainda não estão claros.

Foi observado que, após a ruptura celular por piroptose, as bactérias permanecem retidas com mobilidade limitada nos remanescentes da célula hospedeira. Essas estruturas foram designadas como armadilhas intracelulares induzidas por poro (PITs, do inglês, *pore-induced intracellular traps*). As bactérias retidas apresentam uma maior sensibilidade aos ROS e uma capacidade restrita de infectar outras células. Adicionalmente, os PITs podem sinalizar a sua destruição por fagócitos, em um processo conhecido como eferocitose (JORGENSEN et al., 2016a, 2016b). Além da piroptose, outra consequência da ativação dos inflamassomas é a clivagem e secreção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, tanto a IL-1 $\beta$  quanto a IL-18 aparentemente não são cruciais para o controle da replicação de *L. pneumophila* (MIAO et al., 2010).

Além do inflamassoma de NAIP5/NLRC4, *L. pneumophila* também ativa o inflamassoma de AIM2. Inicialmente, foi demonstrado que essa bactéria expressa uma proteína efetora denominada SdhA que previne a morte dos macrófagos, permitindo, assim, maior replicação bacteriana (LAGUNA et al., 2006). Posteriormente, a proteína SdhA foi caracterizada como a responsável por manter a integridade do LCV e, conseqüentemente, impede acesso do DNA bacteriano ao citosol e a ativação do inflamassoma de AIM2 (CREASEY; ISBERG, 2012; GE et al., 2012). A ativação de AIM2 pela *L. pneumophila* resulta na ativação de Caspase-1, piroptose e secreção de IL-1 $\beta$  (GE et al., 2012).

Independente de NAIP5/NLRC4, o LPS da *L. pneumophila* é reconhecido pela Caspase-11 e promove a ativação do inflamassoma (CASE et al., 2013). Como consequência, ocorre a piroptose por meio clivagem de GSDMD, bem como a secreção de IL-1 $\alpha$  (CASE et al., 2013; CASSON et al., 2013). Os poros levam ao efluxo de K<sup>+</sup>, um estímulo importante para ativação do inflamassoma de NLRP3 (CASSON

et al., 2013). De forma interessante, Cunha e col. (2017) mostraram que a ação conjunta dos inflamassomas de AIM2 e Caspase-11 induz danos na membrana celular, o que resulta na ativação de NLRP3 mediante efluxo de K<sup>+</sup> (CUNHA et al., 2017). Além disso, animais *Aim2/casp11*<sup>-/-</sup> infectados com *L. pneumophila* deficiente para flagelina são mais suscetíveis à infecção. Embora a principal via de controle bacteriano ocorra pelo reconhecimento da flagelina e ativação do inflamassoma de NLRC4, acredita-se que os outros inflamassomas cooperam para potencializar a restrição bacteriana eficiente por meio da formação de poro (CUNHA et al., 2017).

#### 1.4 Resposta imunológica durante a infecção por *L. longbeachae*

Apesar de existirem diversos estudos que descrevem a resposta imune inata durante a infecção por *L. pneumophila*, ainda há uma lacuna na literatura em relação aos estudos que exploram os mecanismos efetores do sistema imune inato operantes durante a infecção por *L. longbeachae*. Dois estudos distintos evidenciaram que, após a infecção, ocorre uma infiltração de células inflamatórias, notadamente neutrófilos, os quais se presume estarem envolvidos nos processos de proteção do hospedeiro (GOBIN et al., 2009; MASSIS et al., 2017). Outras células importantes na resposta tardia são as células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (ATAIDE et al., 2023). Entretanto, os mecanismos exatos das moDCs no controle de *L. longbeachae* necessitam de investigações mais aprofundadas.

Diferentes estudos mostram que *L. longbeachae* é letal em murinos e se dissemina para o baço, fígado e o sangue, diferentemente da *L. pneumophila* (ASARE et al., 2007; GOBIN et al., 2009; PEREIRA et al., 2011a). Dois fatores podem explicar o aumento da suscetibilidade, os quais são: a presença de cápsula e a ausência de flagelina (CAZALET et al., 2010; KOZAK et al., 2010; SILVEIRA; ZAMBONI, 2010). Entretanto, mesmo as infecções com *L. pneumophila* deficiente para flagelina (*flaA*<sup>-</sup> *Lpn*) não são capazes de induzir morte em modelo murino, indicando que existe outro parâmetro envolvido na doença causada pela *L. longbeachae*.

Ademais, em comparação com a *L. pneumophila*, observa-se que *L. longbeachae* induz uma produção reduzida de citocinas em macrófagos humanos e camundongos (MASSIS et al., 2017). Contudo, as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  demonstram ser cruciais para a resistência à infecção (MASSIS et al., 2017). Esse papel mais silencioso poderia estar relacionado à sua maior replicação no pulmão de

camundongos infectados, bem como a sua disseminação e indução de morte no hospedeiro.

Tendo em vista o papel crucial dos inflamassomas no controle da replicação de *L. pneumophila*, é de extrema importância o estudo dessas moléculas inflamatórias utilizando uma bactéria mais silenciosa e virulenta, como a *L. longbeachae*. A partir disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ativação dos diferentes inflamassomas e sua relevância no controle da replicação durante a infecção por *L. longbeachae*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a ativação dos inflamassomas e a sua relevância no controle da replicação bacteriana durante a infecção por *L. longbeachae* tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Comparar a ativação do inflamassoma entre *L. longbeachae* e *flaA<sup>-</sup> Lpn in vitro*;
2. Determinar o principal inflamassoma ativado por *L. longbeachae in vitro*;
3. Investigar a importância de ASC, Caspase-1, Caspase-11, GSDMD, AIM2 e NLRP3 no controle da replicação de *L. longbeachae in vitro*;
4. Avaliar a contribuição de ASC, Caspase-1, Caspase-11, GSDMD, AIM2, NLRP3 e IL-18 no controle da replicação de *L. longbeachae in vivo*;
5. Examinar o papel da Caspase-8 no controle da replicação de *L. longbeachae in vitro e in vivo*;
6. Investigar a possível cooperação de Caspase-8 e GSDMD no controle de *L. longbeachae in vivo*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Os camundongos empregados neste estudo foram acasalados e criados nas instalações de biotérios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. A manipulação dos animais foi de acordo com as diretrizes éticas para pesquisa com animais, conforme aprovado pela CETEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) sob o protocolo número 218/2014 e 1248/2023, em conformidade com as normativas estabelecidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal). A eutanásia dos camundongos foi realizada por meio de asfixia por CO<sub>2</sub>, seguida por deslocamento cervical. As linhagens utilizadas foram: C57BL/6 (Jax 000664), *Casp1/11*<sup>-/-</sup> (LI et al., 1995), *Casp11*<sup>-/-</sup> (KAYAGAKI et al., 2011), *Casp1*<sup>-/-</sup> (RAUCH et al., 2017), *Asc/casp1/11*<sup>-/-</sup> (MASCARENHAS et al., 2017), *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (RAUCH et al., 2017), *Aim2*<sup>-/-</sup> (JONES et al., 2010), *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (MARIATHASAN et al., 2006), *Ripk3*<sup>-/-</sup> (GONÇALVES et al., 2019), *Casp8*<sup>-/-</sup> (RAUCH et al., 2017). Camundongos deficientes em mais de um gene não descrito acima (*Casp8/ripk3*<sup>-/-</sup>, *Casp8/1/ripk3*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup>/*casp8/ripk3*<sup>-/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup>/*casp8/1/ripk3*<sup>-/-</sup>) foram gerados neste estudo pelo cruzamento de uma progênie F1 das linhagens parentais.

#### 3.2 Cultura e preparo de bactérias

Foram utilizadas as bactérias: *L. longbeachae* NSW 150 resistente a estreptomicina e sua cepa mutante para *dotB*<sup>-</sup> (MASSIS et al., 2017); e a cepa *L. pneumophila* JR32 deficiente em flagelina (*flaA*<sup>-</sup> *Lpn*) (PEREIRA et al., 2011b).

As bactérias foram cultivadas em ágar-carvão com extrato de levedura (CYE, 10 g/L de ácido 4-morfolinopropanosulfônico (MOPS) ou ácido N-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfônico (ACES), 10 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de ágar técnico, 2 g/L de carvão ativado, suplementado com 0,4 g/L de L-cisteína e 0,135 g/L de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) a 35-37°C por 4 dias a partir de estoques congelados. Colônias isoladas foram estriadas em placas novas e incubadas por mais 2 dias. Para infecções *in vitro* e *in vivo*, as bactérias, *L. longbeachae* e *L. longbeachae dotB*<sup>-</sup>, cultivadas em placas sólidas foram ressuspendidas e diluídas em RPMI, como indicado por Massis *et al.* (2017). Para infecções *in vitro*, a bactéria *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* cultivada em placas sólidas foi



ressuspendida e diluída em água destilada. Para infecções *in vivo*, a bactéria *flaA<sup>-</sup> Lpn* foi ressuspendida em água destilada autoclavada e diluídas em PBS.

### 3.3 Obtenção e infecção de macrófagos derivados de medula óssea

Para a cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs), foram retirados fêmures e tíbias de animais eutanasiados por dose excessiva de anestésico. As células precursoras de macrófagos obtidas da medula óssea de camundongos foram diferenciadas *in vitro* durante 7 dias em meio RPMI 1640 +HEPES suplementado com 20% de SBF (Soro Fetal Bovino), 30% de LCCM (*L Cell Conditioned Medium*), 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (MARIM et al., 2010). Após a diferenciação, os macrófagos foram coletados pela lavagem das monocamadas com PBS (*phosphate-buffered saline*) pH 7,4 gelado, e posteriormente, distribuídos em placas de poços tratadas e cultivados em meio RPMI 1640 +HEPES contendo 10% de SBF e 2 mM L-Glutamina para serem posteriormente infectados.

### 3.4 Infecções *in vivo* e coleta do Lavado Broncoalveolar (BAL)

Todos os camundongos utilizados neste projeto foram pareados por sexo e idade. As infecções ocorreram após 8 semanas de idade. Anteriormente às infecções, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (300mg/kg e 30mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal. Após anestesiados, os camundongos foram infectados com 10<sup>5</sup> ou 10<sup>6</sup> de *L. longbeachae* em 40 µL RPMI 1640+HEPEs para realização do ensaio de UFC (Unidade Formadora de Colônia, do inglês, *Colony-Forming Unit*) nos pulmões dos grupos de camundongos. Para coleta de BAL, os animais foram infectados com 10<sup>7</sup> de *L. longbeachae* em 40 µL de RPMI 1640+HEPES.

Com 48, 72 e 96 horas pós-infecção, os pulmões foram coletados e macerados por 15 minutos em 1 mL de água destilada autoclavada (para *flaA<sup>-</sup> Lpn*) ou 1 mL de RPMI puro (para *L. longbeachae*) usando um homogeneizador de tecidos, *Tissue Lyser*. As diluições foram plaqueadas em CYE suplementado com 10 µg/mL de estreptomicina e as placas foram incubadas por 4 dias a 35°C para contagem das UFCs.

Para a retirada do BAL, os camundongos foram sacrificados com altas doses de cetamina e xilazina. Posteriormente, 1mL de PBS-EDTA (5mM de EDTA) foi injetado

na traqueia do animal para a retirada do BAL. O líquido coletado foi utilizado para avaliar ativação de Caspase-8. Além disso, por meio do BAL mensuramos a proteína total pelo método de Bradford (MASSIS et al., 2017). E ainda, as porcentagens de neutrófilos foram estimadas pela contagem microscópica de células no BAL que foram coradas por hematoxilina e eosina.

### 3.5 Ensaio de liberação de LDH

BMDMs ( $5 \times 10^5$ /poço) foram plaqueados em placas de 24 poços (Becton Dickinson Labware, N.J, USA). No dia seguinte, as células foram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) 10 de *L. longbeachae*, *L. longbeachae dotB<sup>-</sup>* ou *flaA<sup>-</sup>Lpn* em meio RPMI sem vermelho de fenol. Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e a morte celular foi medida pelo ensaio de liberação de LDH, usando o kit *CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega)*, seguindo as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram representados em porcentagem (%) em relação a morte celular induzida pela lise do detergente (Triton X-100 9%).

### 3.6 Dosagem de IL-1 $\beta$ e IL-1 $\alpha$ por ELISA

Para a dosagem de IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  por meio da técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), foram plaqueados  $5 \times 10^5$  de BMDMs/poço em placas de 24 poços. No dia seguinte, as células foram infectadas com MOI 10 de *L. longbeachae* ou *flaA<sup>-</sup>Lpn*. Posteriormente, foram incubadas por 24 horas a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub>, e seus sobrenadantes foram coletados para a dosagem de citocinas utilizando os kits de ELISA (IL-1 $\beta$  - *R&D Systems*; IL-1 $\alpha$  - *BD Biosciences*), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.7 Ensaio de replicação *in vitro*

Para realização da curva de crescimento de *L. longbeachae*, a bactéria foi adicionada a cada poço, contendo  $2 \times 10^5$  de BMDMs, com MOI de 0,015 ou 10. Após 24, 48, 72 e 96 horas, o sobrenadante da cultura dos macrófagos infectados foi retirado e as células aderidas foram lisadas com água estéril. O lisado foi adicionado ao sobrenadante de cultura das células separado na etapa anterior, garantindo que o

maior número de bactérias de cada poço fosse obtido. O conteúdo retirado de cada poço foi plaqueado em placas contendo meio CYE Agar e a quantidade das UFCs foi obtida a partir da contagem de colônias bacterianas visualizadas após 4 dias de incubação em estufa 37°C (MARIM et al., 2010).

### 3.8 Western Blotting

Para os ensaios de detecção de Caspase-1, GSDMD e IL-1 $\beta$  clivada por WB (*Western Blotting*), foram plaqueadas 10<sup>6</sup> células/poço de BMDMs em placas de 48 poços. Essas células foram previamente ativadas com LPS ultrapuro (100 ng/mL) por 4 horas e então infectadas com MOI 10 de *L. longbeachae*, *L. longbeachae dotB<sup>-</sup>* ou *flaA<sup>-</sup> Lpn* por 4, 6, 8 ou 10 horas. Os sobrenadantes foram coletados e precipitados com 50% de ácido tricloroacético e acetona. As células nos poços foram lisadas com tampão RIPA (10 mM Tris-HCl; pH 7,4; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 1% desoxicolato e 0,1% SDS) contendo um coquetel de inibidores de protease. Os lisados e sobrenadantes foram ressuspensos em tampão de amostra contendo SDS (50 mM Tris pH 6,8; 2% SDS; 0,1% azul de bromofenol; 10% glicerol; 2,5%  $\beta$ -mercaptoetanol). As amostras foram separadas em gel de SDS-PAGE 15% e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,22  $\mu$ m, utilizando o sistema de transferência *Semidry Transfer Cell (Bio-Rad)*. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente em tampão TBS (*Tris Buffered Saline*) (60,5 g/L de Tris e 87,5 g/L de NaCl com pH ajustado para 8,0 com HCl, mais 0,01% de Tween-20) e 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos monoclonais anti-caspase-1 de *rat p20* (Genentech, 1:1000), anti-GSDMD de *rabbit* (Abcam, Ab209845, 1:1000) e anti-IL-1 $\beta$  de *goat* (diluição 1: 1000, Sigma, I3767, 1:1000) e deixadas overnight a 4°C. Após a incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas novamente três vezes com TBS-Tween e incubadas por 1 hora a 25°C com anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (diluição 1:3000; KPL, USA). Em seguida, foi utilizado *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)* para a detecção dos anticorpos marcados observados no aparelho *Amersham Imager 600 (GE Healthcare)*.

### 3.9 Ensaios de imunofluorescência

Os BMDMs ( $2 \times 10^5$ / poço em placas de 24 poços) foram previamente ativados com LPS ultrapuro (100 ng/mL) por 4 horas. Antes da infecção, as células foram tratadas com 20  $\mu$ M de Z-VAD (*Promega*) por 1 hora e, então, infectadas com MOI 10 de *L. longbeachae* ou *flaA<sup>-</sup> Lpn* por 4 horas. Após a infecção, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente, bloqueadas e permeabilizadas usando PBS contendo 5% de soro de cabra e 0,05% de saponina durante 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos usados foram: ASC (anti-ASC de *rabbit*, 1:2000, Adipogen AL177), NLRP3 (anti-NLRP3 de *mouse*, 1:2000, AdipoGen) e AIM2 (*rabbit* anti-AIM2 de *rabbit*, 1:2000, *Cell Signaling*). O anticorpo foi diluído em solução de bloqueio e adicionados a cada lamínula. Após 1h de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e então incubadas com os anticorpos secundários conjugados com os fluoróforo, Alexa Fluor 594 ou 647 (*Life Technologies*). Posteriormente, as lâminas foram lavadas e montadas em lâminas de vidro com meio de montagem *Prolong® Gold (Molecular Probes)* contendo DAPI (do inglês, 4',6-diamidino-2-phenylindole). Os números de puncta foram avaliados observando 300 células em microscópio invertido LEICA DMI 4000B com objetiva de 100X (*Leica Microsystems*).

### 3.10 Ativação de Caspase-8

Para avaliar a ativação da Caspase-8 no BAL, utilizamos o kit o Caspase-8 *Glo Assay (Promega)*, seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.11 Ensaio de formação de poros

A formação de poros em BMDMs foi quantificada com base na permeabilidade da membrana celular ao iodeto de propídio (PI) em células danificadas, conforme descrito anteriormente (CASE et al., 2013). Os BMDMs foram semeados em uma placa preta de 96 poços de fundo transparente ( $1 \times 10^5$  células/poço). Antes da infecção, o meio foi substituído por RPMI sem vermelho de fenol, contendo 15 mM de HEPES, 0.038 g/mL de  $\text{NaHCO}_3$ , suplementado com 2% de SBF, 2 mM de L-Glutamina e posteriormente adicionado 6  $\mu$ L de PI e anticorpo anti- *L. longbeachae* (1:1000). Os BMDMs infectados foram mantidos a 37 °C e o PI foi excitado a 538 nm. A emissão de fluorescência foi lida a 617 nm a cada 5 minutos usando um fluorômetro

de placa (SpectraMax i3x, Molecular Devices). A formação total de poros foi determinada pela lise das células com a adição de Triton X-100 9% (34 µL/poço) em um volume de 200 µL de RPMI.

### 3.12 Ensaio de mortalidade

Para esse ensaio foram utilizados 10 camundongos por grupo, inoculados intranasal com  $10^6$  de *L. longbeachae*. Após a infecção, os camundongos foram acompanhados por um período de 10 dias. Os camundongos que vierem a óbito durante o período foram anotados para construção da curva de sobrevivência dos respectivos animais.

### 3.13 Análises Estatísticas

Os resultados foram representados como média mais desvio padrão (SD). Para comparação entre múltiplos grupos, foi realizada a análise de variância (two-way ANOVA ou one-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Diferenças nos valores entre dois grupos foram determinadas utilizando o teste *t de Student* ou Mann-Whitney. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software *GraphPad-Prism* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego CA, EUA), e as diferenças estatisticamente significativas foram aquelas que apresentaram valores de P igual ou menor a 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 *L. longbeachae* induz a clivagem da GSDMD e uma secreção reduzida de IL-1 $\beta$ quando comparada à *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* em macrófagos

Os inflamassomas desempenham papéis significativos na imunidade do hospedeiro contra diversas bactérias, incluindo aquelas desprovidas de flagelo e encapsuladas, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae* (CODO et al., 2018; WANG et al., 2017, 2023; WAWROCKI; DRUSZCZYNSKA, 2017). No entanto, ainda não está claro se *L. longbeachae* é capaz de induzir a ativação dos inflamassomas. Com o objetivo de esclarecer os mecanismos específicos da resposta imune na interação entre o hospedeiro e *L. longbeachae*, realizamos a infecção de BMDMs de animais C57BL/6. Em seguida, realizamos uma análise dos produtos de ativação dos inflamassomas, estabelecendo comparações com a bactéria *flaA*<sup>-</sup> *Lpn*, tendo em vista que ambas são desprovidas de flagelo.

Para avaliar a clivagem de GSDMD por *L. longbeachae*, BMDMs tratados com LPS por 4h (*priming*) foram infectados com *L. longbeachae* ou *flaA*<sup>-</sup> *Lpn*. Foi observado que *L. longbeachae* induz a clivagem de GSDMD de maneira semelhante à *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* (Figura 2A). Sabe-se que o T4SS desempenha um papel crucial no estabelecimento da infecção e na virulência de *L. longbeachae* (MASSIS et al., 2017), assim sendo, investigamos a importância desse sistema de secreção na ativação do inflamassoma. Para isso, infectamos também os BMDMs com a cepa de *L. longbeachae* deficiente para *dotB*<sup>-</sup>, um gene responsável pela codificação da ATPase que impulsiona a translocação das proteínas efetoras do T4SS (MASSIS et al., 2017; WOOD et al., 2015). Observamos que o sistema de secreção Dot/Icm é importante para clivagem de GSDMD (Figura 2A).

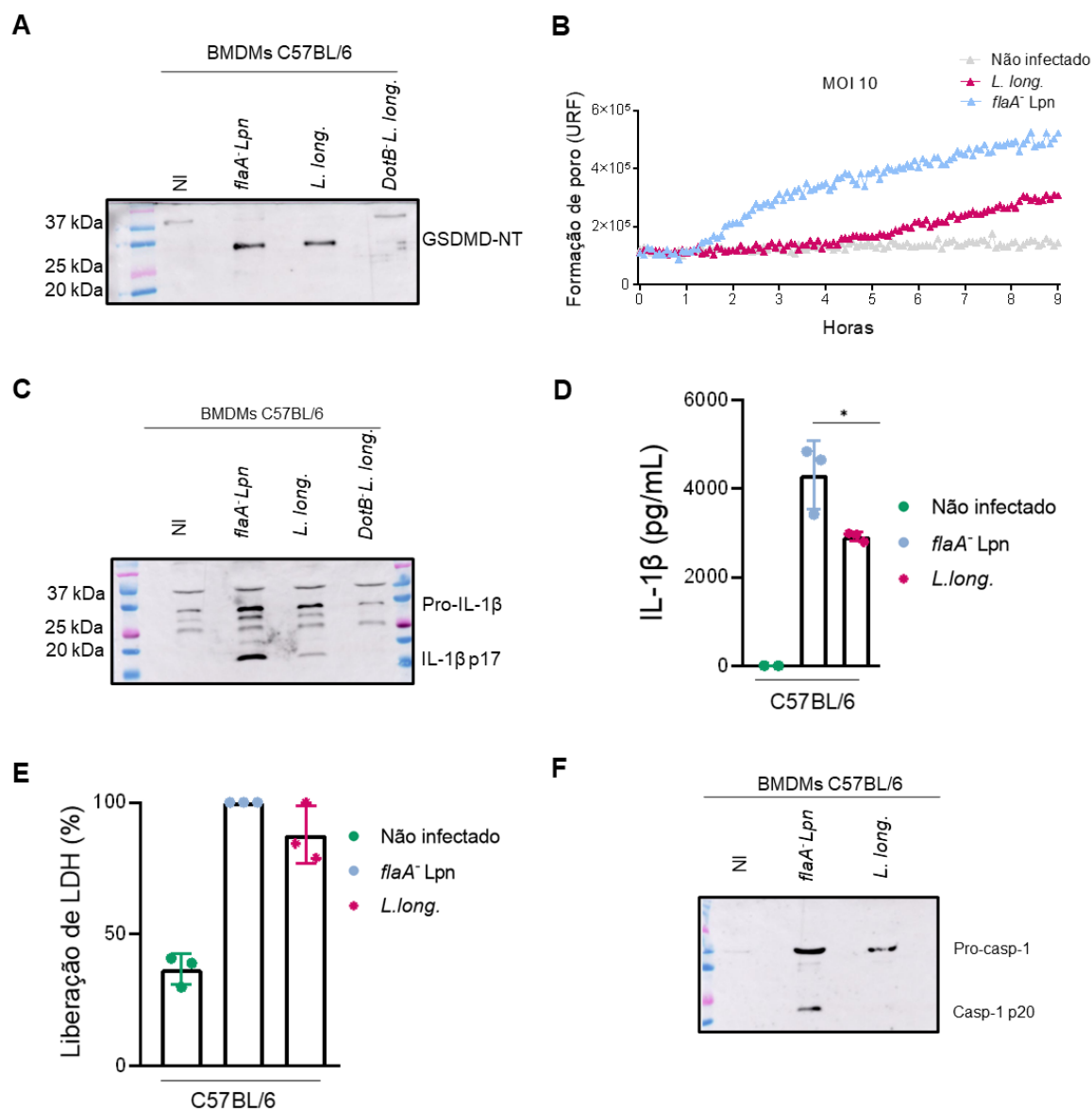
Em seguida, avaliamos, se *L. pneumophila* e *L. longbeachae* possuem a mesma capacidade de formar poros na membrana celular. Para isso, realizamos a quantificação da formação de poros com base na incorporação de iodeto de propídio durante 9 horas de infecção. De forma interessante, observamos que *L. longbeachae* induz uma menor formação de poros, comparando-se com a *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* (Figura 2B). Após a clivagem de GSDMD, o seu fragmento N-terminal transloca para a membrana celular, o que resulta na formação dos poros, crucial para a liberação de citocinas pró-

inflamatórias, como IL-1 $\beta$  (BROZ; DIXIT, 2016). Confirmando esses dados, observamos uma redução na clivagem e secreção de IL-1 $\beta$  (Figura 2C e 2D). Adicionalmente, o resultado obtido com a cepa mutante para *dotB*<sup>-</sup> sugere que a clivagem de IL-1 $\beta$  é dependente do T4SS (Figura 2C). Outro parâmetro para a avaliação da piroptose envolve a quantificação da liberação de LDH. Assim, observou-se uma discreta redução na liberação de LDH durante a infecção por *L. longbeachae* em comparação com a *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* (Figura 2E). Além da piroptose, esse dado também pode estar relacionado à elevada taxa de replicação bacteriana, que induz a lise celular para infectar novas células.

A clivagem de Caspase-1 é um evento central na ativação dos inflamassomas (MIAO et al., 2010). Ao comparar BMDMs primados por 4 horas com LPS e infectados com *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* por 8 horas, observou-se que *L. longbeachae* não induziu a clivagem de Caspase-1 (Figura 2F).

Juntos, esses dados indicam que, independentemente de flagelina, tanto *L. longbeachae* quanto *flaA*<sup>-</sup> *Lpn*, desencadeiam a ativação dos inflamassomas, conduzindo à clivagem de GSDMD, à piroptose e à liberação de IL-1 $\beta$ . Entretanto, modulam esse mecanismo de defesa do hospedeiro de maneira distinta.

Figura 2 - *L. longbeachae* induz a clivagem da GSDMD e uma secreção reduzida de IL-1 $\beta$  quando comparada à *flaA*-*Lpn* em macrófagos.



Fonte: Da autora (2024). *L. longbeachae* induz a clivagem da GSDMD e uma secreção reduzida de IL-1 $\beta$  quando comparada à *flaA*-*Lpn* em macrófagos. **(A)** Western Blotting da clivagem de GSDMD no lisado de macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMs) de animais C57BL/6. BMDMs foram primados com LPS (100 ng/mL) por 4h, infectados com MOI 10 de *L. pneumophila* deficiente em flagelina (*flaA*-*Lpn*), *L. longbeachae* (*L. long.*) ou *L. longbeachae* deficiente para *dotB*<sup>-</sup> (*dotB*<sup>-</sup> *L. long.*) durante 8h. **(B)** Quantificação fluorométrica da captação de iodeto de propídio (PI) ao longo do tempo, expressa em unidades de fluorescência relativa (RFUs). BMDMs de animais C57BL/6 foram infectados com MOI 10 de *L. pneumophila* deficiente (*flaA*-*Lpn*) ou *L. longbeachae* (*L. long.*) por 9 horas. BMDMs de animais C57BL/6 não infectados foram usados como controle negativo. **(C)** Western Blotting de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de BMDMs de animais C57BL/6. BMDMs foram primados com LPS (100 ng/mL) por 4h, infectados com MOI 10 de *L. pneumophila* deficiente em flagelina (*flaA*-*Lpn*), *L. longbeachae* (*L.*



*long*) ou *L. longbeachae* deficiente para *dotB*<sup>-</sup> (*dotB*<sup>-</sup> *L. long.*) durante 8h. **(D)** IL-1 $\beta$  liberada no sobrenadante de BMDMs de animais C57BL/6 e detectada pelo método de ELISA. BMDMs foram infectados com MOI 10 com *L. pneumophila* deficiente (*flaA*<sup>-</sup>*Lpn*) ou *L. longbeachae* (*L. long.*). \* p<0,05 comparou BMDMs de animais C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* com BMDMs de animais C57BL/6 infectados com *flaA*<sup>-</sup> *L. pneumophila*. **(E)** A citotoxicidade foi medida por meio do ensaio de liberação de LDH (lactato desidrogenase). BMDMs de animais C57BL/6 foram infectados com *L. pneumophila* deficiente em flagelina (*flaA*<sup>-</sup> *Lpn*) ou *L. longbeachae* (*L. long.*). Após 24h de infecção, o sobrenadante dessas células foi coletado e a dosagem foi feita por meio do kit *CytoTox96 LDH-release*. As porcentagens de liberação de LDH foram estimadas em relação as células lisadas com Triton X-100 9%. **(F)** Western Blotting de IL-1 $\beta$  no sobrenadante BMDMs de animais C57BL/6. BMDMs foram primados com LPS (100 ng/mL) por 4h, infectados com MOI 10 de *L. pneumophila* deficiente (*flaA*<sup>-</sup>*Lpn*) ou *L. longbeachae* (*L. long.*) durante 8h.  $\pm$  desvio padrão das triplicatas. A análise estatística realizada em D e E foi *t Student* não pareado. Os dados das figuras A, B, C e D apresentam um experimento representativo de dois experimentos com resultados similares. Os demais representam um experimento representativo de um experimento realizado.

#### 4.2 *L. longbeachae* desencadeia a ativação do inflamassoma não-canônico de NLRP3 em macrófagos

*L. pneumophila* é capaz de induzir a ativação dos inflamassomas de NLRP3, AIM2 e NAIP5/NLRC4, após o reconhecimento de LPS e efluxo de potássio, dsDNA e flagelina, respectivamente (MASCARENHAS; ZAMBONI, 2017). No entanto, o inflamassoma preponderante, responsável pelo controle eficaz em macrófagos - células que desempenham papel como nicho replicativo para a bactéria - é o inflamassoma de NAIP5/NLRC4. A ausência de codificação de flagelina em *L. longbeachae*, por sua vez, impede a ativação do inflamassoma de NAIP5/NLRC4. Diante da observação de que essa bactéria ativa também os inflamassomas, avaliamos quais desses são cruciais para a clivagem de GSDMD e a subsequente secreção de IL-1 $\beta$  em BMDMs. Para isso, infectamos com MOI 10 de *L. longbeachae* os BMDMs dos animais *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Asc/casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Casp11*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> e *Aim2*<sup>-/-</sup>, a fim de determinar os componentes importantes para a clivagem de GSDMD. De forma interessante, foi observado que durante as 4 horas de infecção, a clivagem de GSDMD não ocorre em células deficientes para Caspase-11 (Figura 3A). O aparecimento do fragmento N-terminal em células *Nlrp3*<sup>-/-</sup> indica a ativação da via não-canônica, o que mostra que a Caspase-11 induz a formação de poros, que pode

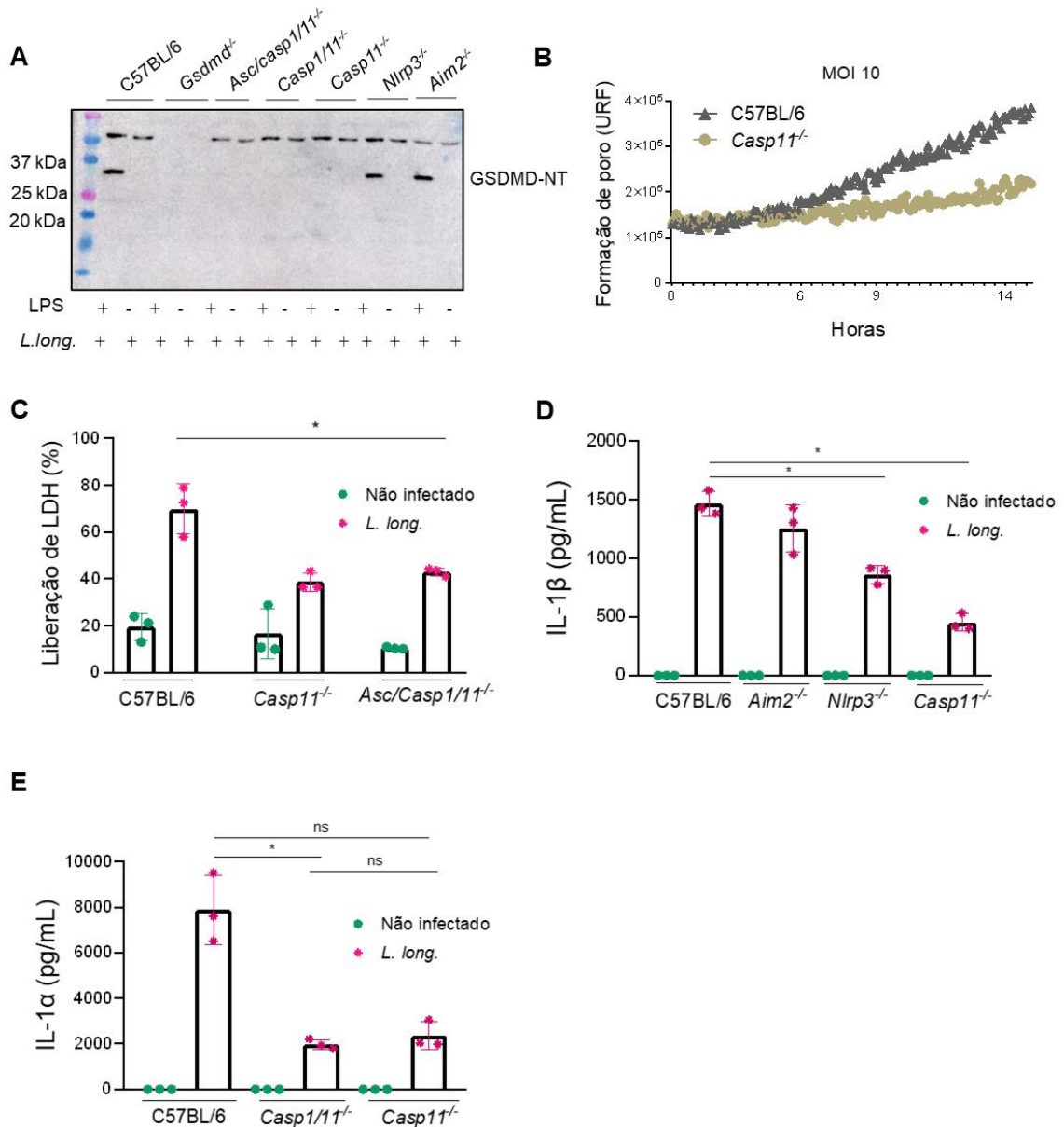
desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3. Além disso, a clivagem de GSDMD ocorre de maneira independente de AIM2 (Figura 3A).

Para compreender o papel da Caspase-11 na piroptose, avaliamos a formação de poro em tempo real. Foi observado que a formação de poro foi reduzida em BMDMs *Casp11<sup>-/-</sup>* em resposta à infecção por *L. longbeachae* (Figura 3B). Como esperado, BMDMs *Casp11<sup>-/-</sup>*, bem como *Asc/Casp1/11<sup>-/-</sup>* infectados, liberaram menos LDH no sobrenadante (Figura 3C).

A Caspase-11 não é capaz de clivar diretamente a pró-IL-1 $\beta$  e a pró-IL-18 e, por isso, requer a ativação secundária do inflamassoma de NLRP3 (DOWNS et al., 2020). Nesse contexto, sugerimos que a secreção de IL-1 $\beta$  é dependente de NLRP3. Ao avaliar a secreção de IL-1 $\beta$  pelo método de ELISA nos BMDMs após 24 horas de infecção por *L. longbeachae*, houve uma redução na secreção dessa citocina em células deficientes para NLRP3 e Caspase-11, mas não em células deficientes em AIM2 (Figura 3D). Além disso, a secreção de IL-1 $\alpha$  induzida pela *L. longbeachae* foi diminuída em BMDMs *Casp11<sup>-/-</sup>* (Figura 3E), o que condiz com os estudos anteriores (CASSON et al., 2013; WANG et al., 2017).

A partir disso, nossos dados demonstram que *L. longbeachae* promove principalmente a ativação do inflamassoma mediada por Caspase-11, o que resulta na subsequente secreção de IL-1 $\beta$  de forma dependente de NLRP3 em macrófagos.

Figura 3 - *L. longbeachae* desencadeia a ativação do inflamassoma não-canônico de NLRP3 em macrófagos.



Fonte: Da autora (2024). ***L. longbeachae* desencadeia a ativação do inflamassoma não-canônico de NLRP3 em macrófagos.** (A) Western Blotting da clivagem de GSDMD no lisado de macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMs) de animais *Asc/casp1/11<sup>-/-</sup>*, *Casp1/11<sup>-/-</sup>*, *Casp11<sup>-/-</sup>*, *Nlrp3<sup>-/-</sup>* e *Aim2<sup>-/-</sup>*. Os BMDMs dos animais C57BL/6 e *Gsdmd<sup>-/-</sup>* foram usados como controle. Os BMDMs foram primados ou não com LPS (100 ng/mL) por 4h, infectados com MOI 10 de *L. longbeachae* (*L. long*) durante 4h. (B) Quantificação fluorométrica da captação de iodeto de propídio (PI) ao longo do tempo, expressa em unidades de fluorescência relativa (RFUs). BMDMs de animais C57BL/6 e *Casp11<sup>-/-</sup>* foram infectados com MOI 10 de *L. longbeachae* (*L. long*) por 15 horas. (C) A citotoxicidade foi medida por meio do ensaio de liberação de LDH (lactato desidrogenase). BMDMs de animais C57BL/6,

*Asc/Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *Casp11<sup>-/-</sup>*, foram infectados com *L. longbeachae* (*L. long.*). Após 24h de infecção, o sobrenadante dessas células foi coletado e a dosagem foi feita por meio do kit *CytoTox96 LDH-release*. As porcentagens de liberação de LDH foram estimadas em relação as células lisadas com Triton X-100 9%.\* p<0,05 comparou BMDMs de animais C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* com BMDMs de animais *Asc/Casp1/11<sup>-/-</sup>* infectados. **(D)** IL-1 $\beta$  liberada no sobrenadante de BMDMs de animais C57BL/6, *Casp11<sup>-/-</sup>*, *Nlrp3<sup>-/-</sup>* e *Aim2<sup>-/-</sup>* e detectada pelo método de ELISA. BMDMs foram infectados com MOI 10 com *L. longbeachae* (*L. long.*). \* p<0,05 comparou BMDMs de animais C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* com BMDMs de animais *Casp11<sup>-/-</sup>* ou *Nlrp3<sup>-/-</sup>* infectados. **(E)** IL-1 $\alpha$  liberada no sobrenadante de BMDMs de animais C57BL/6, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e detectada pelo método de ELISA. BMDMs foram infectados com MOI 10 de *L. longbeachae* (*L. long.*). \* p<0,05 comparou BMDMs de animais C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* com BMDMs *Casp1/11<sup>-/-</sup>* infectados. ns: não significativo.  $\pm$  desvio padrão das triplicatas. A análise estatística realizada em C, D e E foi *t Student* não pareado. Todos os dados representam um experimento representativo de um experimento realizado.

#### 4.3 *L. longbeachae* ativa os inflamassomas de NLRP3 e AIM2 em macrófagos

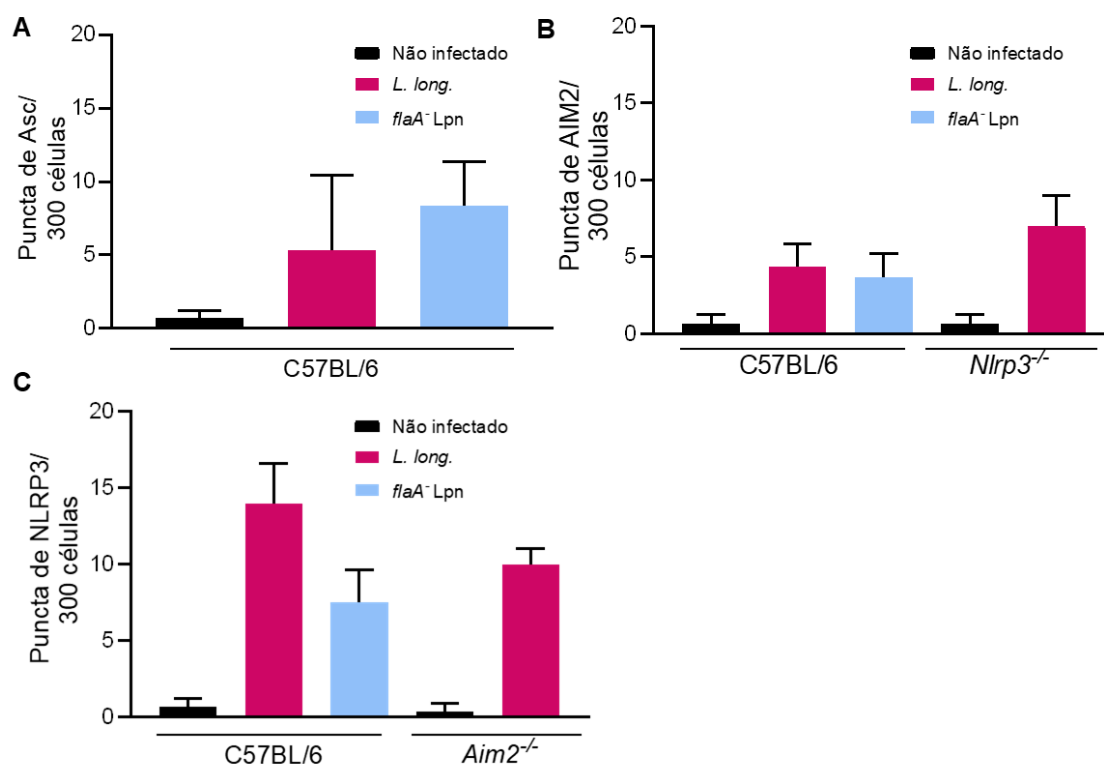
*L. pneumophila* induz a ativação da Caspase-11 por meio do reconhecimento do LPS e, simultaneamente, ativa AIM2 após o reconhecimento de dsDNA bacteriano. Ambas as vias resultam no dano à membrana celular, o qual propicia o efluxo de K<sup>+</sup> e, conseqüentemente, a ativação de NLRP3. Essas evidências sugerem uma redundância nas vias dos inflamassomas durante a infecção por *L. pneumophila* (CUNHA; ZAMBONI, 2014).

Neste estudo, *L. longbeachae* também desencadeia a ativação do inflamassoma de NLRP3, principalmente pela via não-canônica mediada pela Caspase-11. Embora a secreção de IL-1 $\beta$  tenha sido reduzida tanto nas células *Nlrp3<sup>-/-</sup>* quanto *Casp11<sup>-/-</sup>* (Figura 3D), os dados sugerem que existe outra via que coopera para a produção de IL-1 $\beta$ . Para investigar essa hipótese, utilizamos BMDMs de animais C57BL/6 para quantificar os puncta de ASC, NLRP3 e AIM2 por imunofluorescência. As células foram previamente primadas com LPS por 4 horas, e depois infectadas com *L. longbeachae* por 4 horas. Os BMDMs infectados com *flaA<sup>-</sup>Lpn* foram usados para compararmos o comportamento de ativação dos inflamassomas das duas bactérias desprovidas de flagelina. Antes da infecção, as células foram tratadas com o inibidor de caspases, Z-VAD (*Promega*), por 1 hora para evitar a morte celular e melhorar a observação da estrutura dos puncta. Demonstramos que *L. longbeachae* induz a ativação de ambos os inflamassomas,

AIM2 e NLRP3, com predominância na ativação de NLRP3 (Figuras 4B e 4C). Embora não tenhamos detectado diferença significativa na formação de agregados proteicos de AIM2 entre as duas bactérias, observamos que *L. longbeachae* levou a uma maior formação de puncta de NLRP3 em comparação à *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* (Figuras 4B e 4C). Por outro lado, BMDMs infectados com *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* apresentaram mais puncta de ASC do que os BMDMs infectados com *L. longbeachae* (Figura 4A).

Ademais, notamos que na ausência de *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, não houve alteração significativa na formação de puncta de AIM2, comparando-se aos BMDMs selvagens (Figuras 4B). No entanto, na ausência de *Aim2*<sup>-/-</sup> houve menos formação de puncta de NLRP3 do que nos BMDMs controle (Figura 4C), o que sugere que pode haver uma interconexão entre eles.

Figura 4 - *L. longbeachae* ativa os inflamassomas de NLRP3 e AIM2 em macrófagos.



Fonte: Da autora (2024). ***L. longbeachae* ativa os inflamassomas de NLRP3 e AIM2 em macrófagos.** (A-E) Formação de puncta de ASC (A), AIM2 (B) ou NLRP3 (C) em macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMs) de animais C57BL/6 (A-C), *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (B) ou *Aim2*<sup>-/-</sup> (C). Os BMDMs foram primados com LPS (100 ng/mL) por 4 horas e posteriormente tratados com inibidor de protease Z-VAD por 1h. Em seguida, as células foram infectadas com MOI 10 de *L. longbeachae* ou *L.*

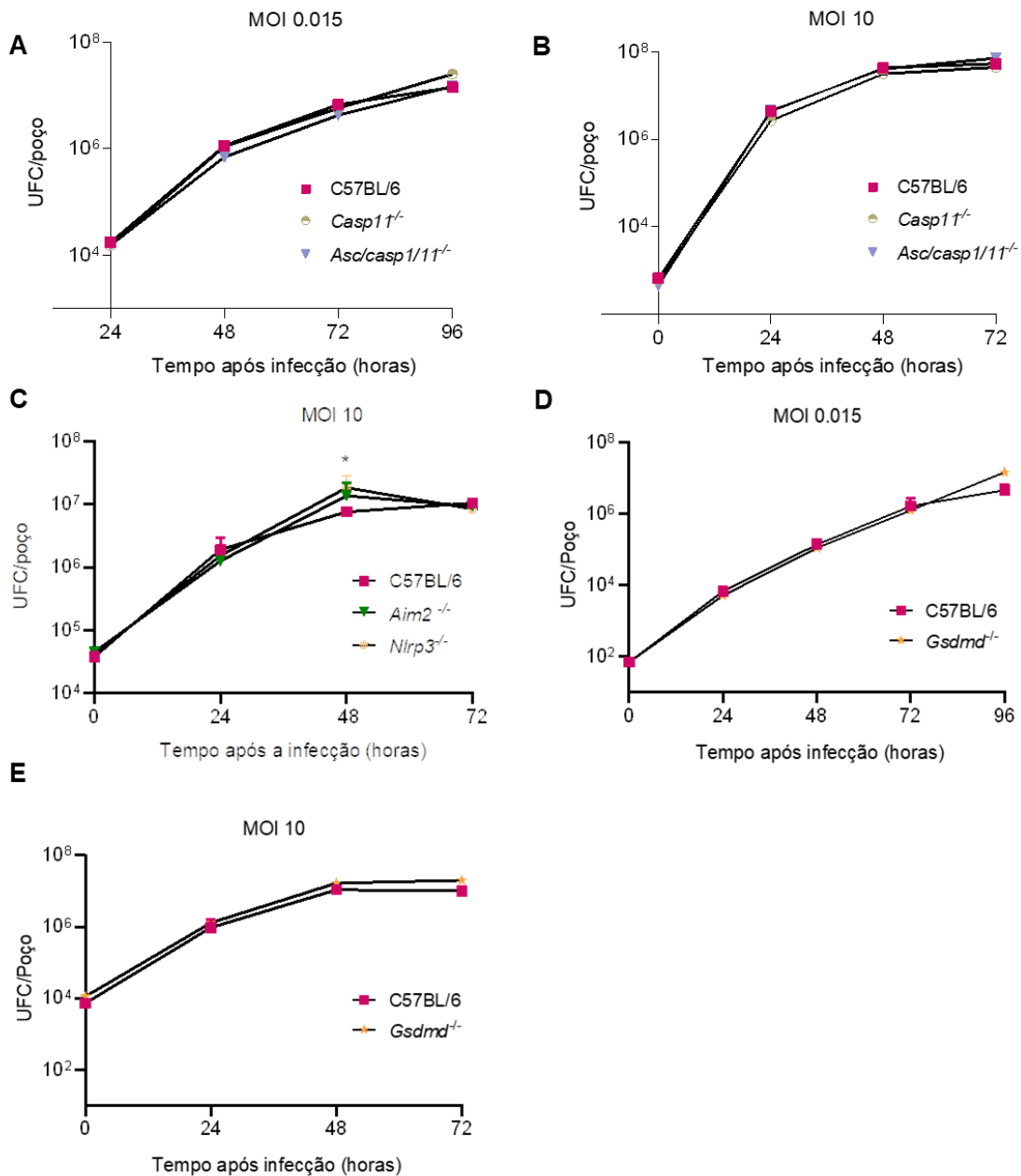
*pneumophila* deficiente (*flaA<sup>-Lpn</sup>*) e fixadas após 4h de infecção. A quantificação foi realizada em 300 células por microscopia de fluorescência.  $\pm$  desvio padrão das triplicatas. Todos os dados representam um experimento representativo de um experimento realizado.

#### 4.4 Caspase-1, Caspase-11, AIM2 e GSDMD são dispensáveis para o controle de *L. longbeachae* em macrófagos

Anteriormente, observamos que a infecção por *L. longbeachae* é capaz de ativar os inflamassomas de NLRP3 (via não-canônica) e AIM2. A partir desses dados, nosso próximo passo foi investigar as implicações da ativação dos inflamassomas na replicação bacteriana *in vitro*. Tendo em vista que identificamos o inflamassoma principal ativado por *L. longbeachae* como sendo o não-canônico de NLRP3, realizamos a infecção inicial dos BMDMs provenientes de animais *Casp11<sup>-/-</sup>* e *Asc/casp1/11<sup>-/-</sup>* com baixo (0,015) ou alto (10) MOI, a fim de determinar as UFCs em intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção (Figuras 5A e 5B). Os resultados mostraram que não houve diferença no crescimento bacteriano entre os diferentes tipos de macrófagos nos dois MOI quando comparados aos BMDMs de animais controle C57BL/6. Além disso, observamos que AIM2 e GSDMD não desempenham papel significativo na restrição bacteriana em macrófagos (Figuras 5C, 5D e 5E). Em conjunto, esses dados sugerem que a ativação dos inflamassomas composto por Caspase-11 e AIM2 é dispensável para o controle de *L. longbeachae in vitro*.

Além disso, ao infectarmos os BMDMs de animais *Nlrp3<sup>-/-</sup>*, notamos uma diferença estatística no aumento da replicação bacteriana em comparação com o controle após 48 horas de infecção (Figura 5C). Tal resultado necessita de estudos adicionais, pois a ativação de NLRP3 está intrinsecamente associada a interação de Caspase-1 e ASC. No entanto, essa diferença não foi observada nos BMDMs de animais *Asc/casp1/11<sup>-/-</sup>*.

Figura 5 - Caspase-1, Caspase-11, AIM2 e GSDMD são dispensáveis para o controle de *L. longbeachae* em macrófagos.



Fonte: Da autora (2024). **Caspase-1, Caspase-11, AIM2 e GSDMD são dispensáveis para o controle de *L. longbeachae* em macrófagos.** (A-E) Replicação bacteriana em macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMs) de animais *Casp11<sup>-/-</sup>*, *Asc/casp1/11<sup>-/-</sup>*, *Aim2<sup>-/-</sup>*, *Nlrp3<sup>-/-</sup>*, *Gsdmd<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 infectados com MOI 0,015 (A e D) e 10 (B, C e E) de *L. longbeachae*. Após 0, 24, 48 e 72h de infecção para MOI 10 e 0, 24, 48, 72 e 96h para MOI 0,015, as células foram lisadas para determinação da Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). ± desvio padrão das triplicatas. \* p<0,05 BMDMs C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* comparado com *Nlrp3<sup>-/-</sup>* infectados. A análise estatística realizada foi ANOVA. Todos os dados representam um experimento representativo de dois experimentos realizados com resultados similares.

#### 4.5 GSDMD e NLRP3 são importantes para o controle de *L. longbeachae in vivo*

Ao contrário da *L. pneumophila*, *L. longbeachae* é letal em murinos, e os mecanismos imunológicos que estão envolvidos na eliminação dessa bactéria intracelular são pouco conhecidos (MASSIS et al., 2017; WANG et al., 2018). Neste contexto, investigamos a relevância da ativação das vias dos inflamassomas no controle de *L. longbeachae in vivo*.

Para isso, infectamos animais *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Casp11*<sup>-/-</sup>, *Asc/casp1/11*<sup>-/-</sup> por via intranasal com 10<sup>5</sup> de *L. longbeachae*. Após 48, 72 e 96 horas, os pulmões foram coletados, macerados e plaqueados em placas CYE para a contagem das UFCs. Foi observado que os animais deficientes para NLRP3 foram mais suscetíveis à infecção após 48 e 72 horas, em comparação aos animais controle C57BL/6 (Figura 6A). Em contrapartida, os animais *Aim2*<sup>-/-</sup> não apresentaram um aumento na replicação bacteriana (Figura 6B).

A GSDMD pode estar envolvida em outros mecanismos de resposta do hospedeiro, que vão além da ativação dos inflamassomas, como a liberação de armadilhas extracelulares e a produção de muco por células epiteliais (SOLLBERGER et al., 2018; ZHANG et al., 2022). Nesse contexto, observamos uma maior replicação bacteriana nos animais *Gsdmd*<sup>-/-</sup> infectados com 10<sup>5</sup> de *L. longbeachae* em comparação com os animais C57BL/6 nas fases de 48 e 72 horas após a infecção (Figura 6A). No entanto, ao aumentar a carga bacteriana para 10<sup>6</sup>, esses animais, bem como os animais deficientes para todas as vias de morte celular piroptótica (*Asc, casp1/11*<sup>-/-</sup>), foram tão suscetíveis quanto os animais controles após 72 horas de infecção (Figura 6C). Conforme esperado, os camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> também apresentaram uma sobrevida menor quando infectados com *L. longbeachae*, possivelmente devido a um dano pulmonar grave (Figura 6D).

Ao avaliar o BAL dos animais infectados, foi observado que, embora os animais *Asc/casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup> e *Casp11*<sup>-/-</sup> tenham demonstrado resistência à infecção houve um aumento parcial no dano pulmonar, conforme indicado pela quantificação de proteínas totais, em comparação aos animais C57BL/6 (Figura 7A). Adicionalmente, ao monitorar os animais *Casp11*<sup>-/-</sup> ao longo de 10 dias, constatamos que eles apresentaram sobrevida semelhante aos animais selvagens (Figura 7B). Resultado semelhante foi observado por Pereira e col. (2011) ao comparar a taxa de



sobrevida entre os animais *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e controle (PEREIRA et al., 2011a). Dessa forma, tanto a Caspase-11 quanto a Caspase-1 mostram-se dispensáveis para a resistência do hospedeiro à *L. longbeachae*.

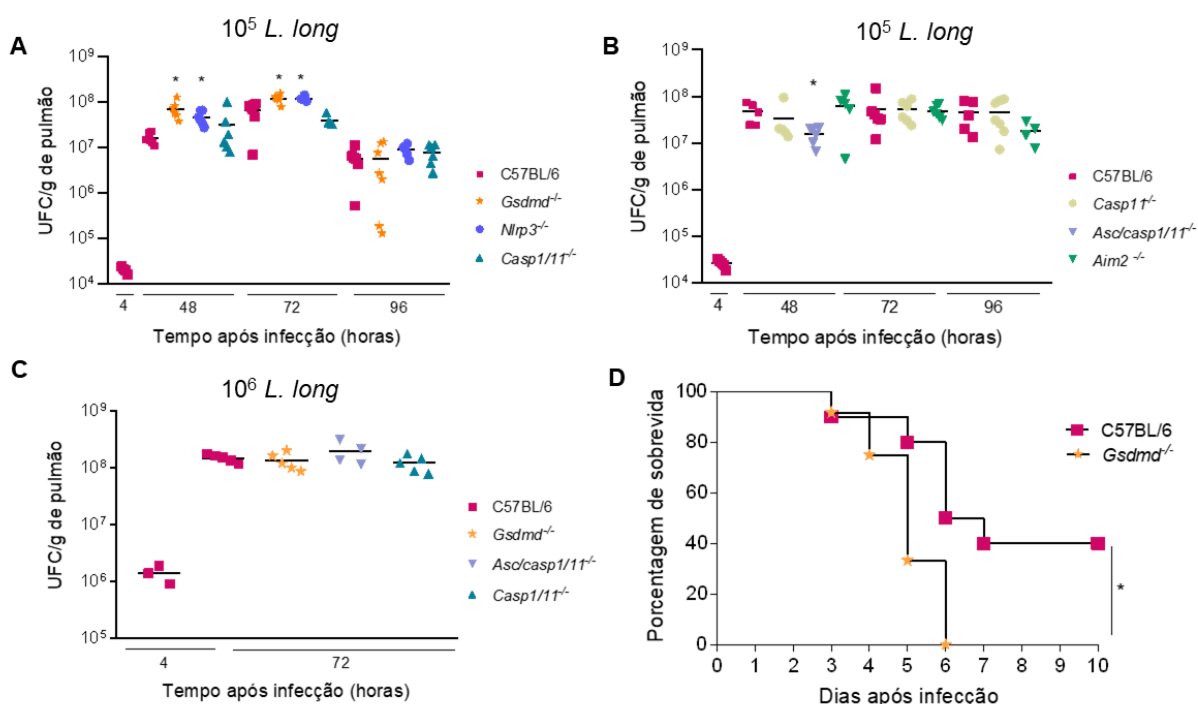
Além das Caspases-1 e -11, a Caspase-8 tem um papel importante na imunidade, desempenhando funções cruciais na sinalização de morte celular e na participação de vias inflamatórias (ORNING; LIEN, 2021). Por isso, tornou-se importante investigar se a atividade de Caspase-8 poderia ser detectada no BAL dos animais infectados com *L. longbeachae* após 72h. O ensaio realizado foi o Caspase-8 *Glo Assay*, o qual permite a detecção de um sinal de luminescência ao adicionar um substrato para a Caspase-8 ativa (MASCARENHAS et al., 2017). Nós detectamos uma atividade de Caspase-8 nos animais C57BL/6, e esta estava ainda aumentada no BAL dos animais *Asc/Casp1/11<sup>-/-</sup>*, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *Casp11<sup>-/-</sup>* (Figura 7C).

Além disso, durante a piroptose, a célula se rompe e, conseqüentemente, libera DAMPs no meio extracelular. Essas moléculas podem desencadear o recrutamento e ativação de outras células, como os neutrófilos, amplificando, assim, a resposta inflamatória (JORGENSEN et al., 2016b; MASCARENHAS et al., 2015). Estudos anteriores mostraram que os neutrófilos são uma das células predominantes no início da infecção por *L. longbeachae* (GOBIN et al., 2009; MASSIS et al., 2017). Com o objetivo de explorar ainda mais o papel dos inflamassomas na resposta imunológica, formulamos a hipótese de que as vias dos inflamassomas são fundamentais para o recrutamento de neutrófilos. No entanto, ao examinar a porcentagem de neutrófilos no BAL de animais deficientes para Caspase-11, Caspase-1/11 e *Asc/casp1/11*, não observamos uma redução significativa dessa população celular em comparação aos animais selvagens (Figura 7D). Tal resultado sugere que o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pulmonar durante a infecção por *L. longbeachae* ocorre de forma independente dos inflamassomas.

Além da piroptose, outro possível mecanismo importante para o controle bacteriano de *L. longbeachae* que ocorre após a ativação das vias de inflamassomas é a secreção de IL-18. A IL-18 é capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células T e células Natural Killer (NK), além de contribuir para a polarização de células T em Th1 (WAWROCKI; DRUSZCZYNSKA, 2017). Além disso, estudos mostraram que a secreção de IFN- $\gamma$  é fundamental para a resistência à infecção por *L. pneumophila* e

*L. longbeachae* (BROWN et al., 2016; MASSIS et al., 2017; SPÖRRI et al., 2006). Em contrapartida, os animais deficientes para IL-18 não apresentaram um aumento na replicação bacteriana quando comparados com os animais C57BL/6 (Figura 7E). Esses resultados sugerem que o controle eficaz dessa bactéria não é estritamente dependente da presença de IL-18, assim como foi observado durante a infecção por *L. pneumophila* (MIAO et al., 2010).

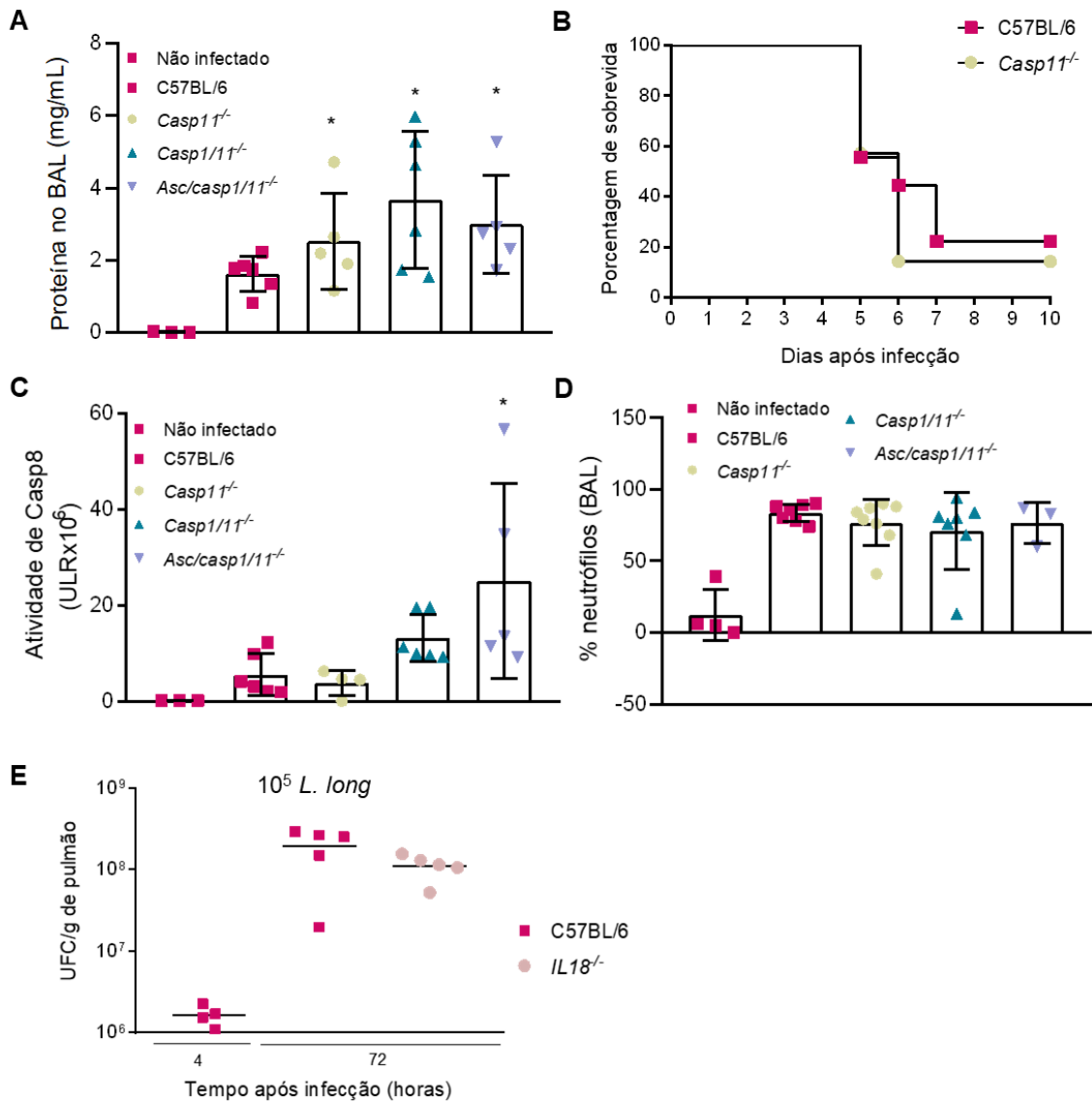
Figura 6 - GSDMD e NLRP3 são importantes para o controle de *L. longbeachae* *in vivo*.



Fonte: Da autora (2024). **GSDMD e NLRP3 são importantes para o controle de *L. longbeachae* *in vivo*.** (A-B) Cinética da replicação bacteriana de animais *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Casp1*<sup>-/-</sup>, *Asc/casp1/11*<sup>-/-</sup> e C57BL/6 após 48, 72 e 96 horas de infecção via intranasal com  $10^5$  de *L. longbeachae*. Os animais foram sacrificados nos momentos indicados após a infecção, e 10  $\mu$ L das diluições dos pulmões triturados foram plaqueados no ágar de extrato de levedura de carvão (CYE) para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por grama de pulmão. (C) Animais *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Asc/casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup> e C57BL/6 foram infectados com  $10^6$  de *L. longbeachae* via intranasal e as UFCs foram determinadas após 72h de infecção. (D) Análise da porcentagem de sobrevivência dos animais *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectados com  $10^6$  de *L. longbeachae* via intranasal ao longo de 10 dias. As linhas horizontais representam a média. Em todos os gráficos \*  $p < 0,05$  animais C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* comparado com os animais *knockout* infectados. A análise estatística realizada foi *t Student* não pareado. A e B representam um experimento representativo de

um experimento, embora outros experimentos foram realizados com os animais somente no tempo de 72h e tiveram resultados similares. C representa um experimento representativo de dois experimentos realizados com resultados similares. D representa um experimento representativo de um experimento realizado.

Figura 7 - A deficiência das vias de inflamassomas gera mais danos no pulmão durante a infecção por *L. longbeachae*.



Fonte: Da autora (2024). **A deficiência das vias de inflamassomas gera mais danos no pulmão durante a infecção por *L. longbeachae*.** (A) Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford no Lavado Broncoalveolar (BAL) de animais *Casp11<sup>-/-</sup>*, *Casp1/11<sup>-/-</sup>*, *Asc/casp1/11<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 infectados ou não com  $10^7$  de *L. longbeachae* durante 72h. (B) Análise da porcentagem de sobrevivência dos animais *Casp11<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 infectados com  $10^6$  de *L. longbeachae* via intranasal ao longo de 10 dias. (D) Quantificação da atividade de Caspase-8 pela adição de substrato luminescente de Caspase-

8 ativa nas amostras de BAL dos animais *Casp11<sup>-/-</sup>*, *Casp1/11<sup>-/-</sup>*, *Asc/casp1/11<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 infectados ou não com  $10^7$  de *L. longbeachae* durante 72h. ULR: Unidades Relativas de Luminescência. **(D)** Porcentagem de neutrófilos no BAL de animais *Casp11<sup>-/-</sup>*, *Casp1/11<sup>-/-</sup>*, *Asc/casp1/11<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 infectados ou não com  $10^7$  de *L. longbeachae*. Os animais foram eutanasiados e o BAL foi coletado após 72h de infecção. **(E)** Animais C57BL/6 e *Il18<sup>-/-</sup>* foram infectados com  $10^5$  de *L. longbeachae* via intranasal e as UFCs foram determinadas após 72h de infecção.  $\pm$  desvio padrão das amostras. Em todos os gráficos \*  $p < 0,05$  animais C57BL/6 infectados com *L. longbeachae* comparado com os animais *knockout* infectados. A análise estatística realizada foi *t Student* não pareado. Todos os dados representam um experimento representativo de um experimento realizado.

#### 4.6 Caspase-8 é importante no controle bacteriano *in vivo* e *in vitro*

Após observarmos a importância de GSDMD para o controle da infecção por *L. longbeachae*, buscamos avaliar qual caspase estaria envolvida na clivagem da GSDMD *in vivo*, uma vez que tanto a Caspase-1 quanto a Caspase-11 mostraram-se irrelevantes para o controle bacteriano. Estudos anteriores mostram que a Caspase-8 é capaz de realizar a clivagem direta da GSDMD (MALIREDDI et al., 2020; ORNING et al., 2018). Além disso, nossos dados prévios sugerem a ativação *in vivo* da Caspase-8. Para avaliar a importância da Caspase-8 durante a infecção por *L. longbeachae*, utilizamos os animais *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>* e *Casp8/1/ripk3<sup>-/-</sup>*, que são duplamente mutantes para Caspase-8 e RIPK3 devido à letalidade embrionária causada pela deleção única de Caspase-8 (KAISER et al., 2011). Com isso, observamos que os animais *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>* e *Casp8/1/ripk3<sup>-/-</sup>* foram significativamente mais suscetíveis à infecção do que os animais C57BL/6 (Figura 8A). Não houve diferença entre os animais *knockout*, sugerindo que a Caspase-8 desempenha um papel crucial no controle de *L. longbeachae*.

Para verificar se a GSDMD e Caspase-8 atuam em vias de controle dependentes ou independentes, infectamos os animais *knockout Gsdmd<sup>-/-</sup>/casp8/ripk3<sup>-/-</sup>* e *Gsdmd<sup>-/-</sup>/casp8/1/ripk3<sup>-/-</sup>*, e comparamos aos animais, *Gsdmd<sup>-/-</sup>* e *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>*. Além disso, utilizamos os animais C57BL/6 e *Ripk3<sup>-/-</sup>* como controles. De forma interessante, não teve aumento da suscetibilidade dos animais *Gsdmd<sup>-/-</sup>/casp8/ripk3<sup>-/-</sup>* e *Gsdmd<sup>-/-</sup>/casp8/1/ripk3<sup>-/-</sup>* comparados com os camundongos *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>*, sugerindo que o efeito de Caspase-8 depende de GSDMD (Figura 8B). Os animais *Gsdmd<sup>-/-</sup>* foram menos suscetíveis do que os animais *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>* (Figura 8B), o que nos leva a hipotetizar que a Caspase-8 também está envolvida em outras

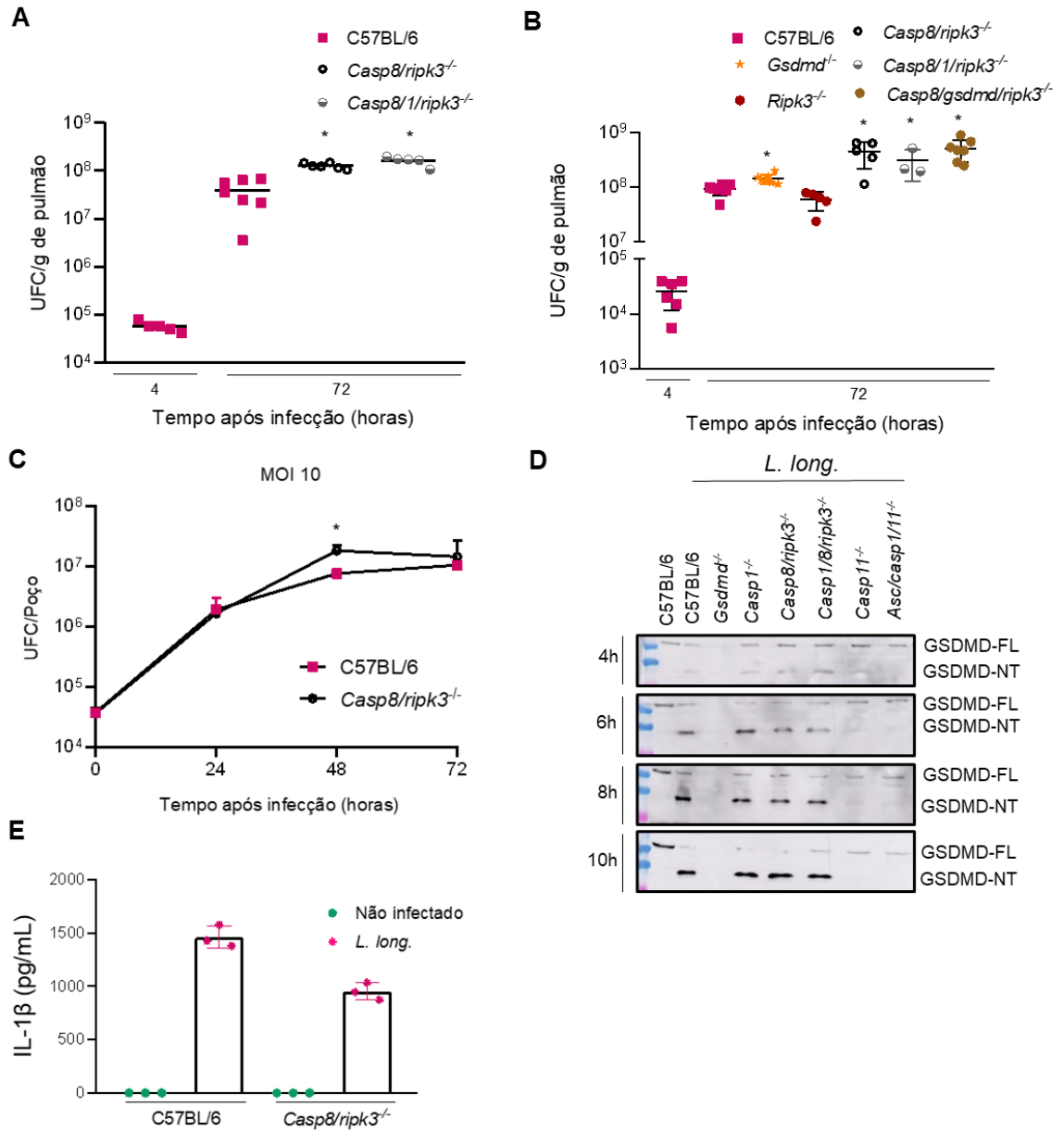
vias de controle da replicação *in vivo*, como a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Em seguida, verificamos se a Caspase-8 também é importante no controle de *L. longbeachae in vitro*, utilizando BMDMs de animais *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>*. Notamos que as células deficientes para Caspase-8 apresentaram um aumento das UFCs após 48 horas de infecção (Figura 8C), consistente com os dados *in vivo*.

Para avaliar se a Caspase-11 é a principal caspase envolvida na clivagem de GSDMD em BMDMs, utilizamos BMDMs deficientes para as diferentes caspases, incluindo a Caspase-8. Dessa forma, os BMDMs foram inicialmente primados com LPS por 4 horas, seguido de infecção com MOI 10 de *L. longbeachae*. Após 4, 6, 8 e 10 horas de infecção, coletamos os lisados celulares para avaliar a clivagem de GSDMD por meio de Western Blotting. A clivagem de GSDMD aumentou ao longo do tempo, ocorrendo de maneira independente das Caspases-8 e -1 (Figura 8D).

Além disso, não observamos um impacto significativo na secreção de IL-1 $\beta$  nos BMDMs *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>* em comparação com os BMDMs controle (Figura 8E). Esses dados reforçam os resultados iniciais, indicando que a via não-canônica do inflamassoma de NLRP3 é responsável pela clivagem de GSDMD e secreção de citocinas por macrófagos. Embora a Caspase-8 não pareça ser crucial para a clivagem de GSDMD e a secreção de IL-1 $\beta$ , sugere-se que ela possa desempenhar um papel em outros mecanismos de defesa celular durante a infecção por *L. longbeachae in vitro*.

Figura 8 - Caspase-8 é importante no controle bacteriano *in vivo* e *in vitro*.



Fonte: Da autora (2024). **Caspase-8 é importante no controle bacteriano *in vivo* e *in vitro*.** (A-B) Animais *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>*, *Casp8/1/ripk3<sup>-/-</sup>*, *Gsdmd<sup>-/-</sup>/casp8/ripk3<sup>-/-</sup>*, *Gsdmd<sup>-/-</sup>/casp8/1/ripk3<sup>-/-</sup>*, *Gsdmd<sup>-/-</sup>*, *Ripk3<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 foram infectados com  $10^5$  de *L. longbeachae* via intranasal e as UFCs foram determinadas após 72h de infecção. Os animais foram sacrificados nos momentos indicados após a infecção, e 10  $\mu$ L das diluições dos pulmões triturados foram plaqueados no ágar de extrato de levedura de carvão (CYE) para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por grama de pulmão. (C) Replicação bacteriana em macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMs) de animais *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>* e C57BL/6 infectados com MOI 10 de *L. longbeachae*. Após 0, 24, 48 e 72h de infecção, as células foram lisadas para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). (D) Western Blotting da clivagem de GSDMD no lisado de BMDMs de *Casp1<sup>-/-</sup>*, *Casp8/ripk3<sup>-/-</sup>*, *Casp8/1/ripk3<sup>-/-</sup>*, *Casp11<sup>-/-</sup>* e *Asc/Casp1/11<sup>-/-</sup>*. Os BMDMs de animais C57BL/6 e *Gsdmd<sup>-/-</sup>* foram usados

como controle. Os BMDMs foram primados com LPS (100 ng/mL) por 4h, infectados com MOI 10 de *L. longbeachae* (*L. long*) durante 4, 6, 8 e 10h.  $\pm$  desvio padrão das amostras. \*  $p < 0,05$  comparado com C57BL/6. A representa um experimento representativo de dois experimentos com resultados similares. Os demais dados representam um experimento representativo de um experimento realizado. A análise estatística realizada foi *t Student* não pareado.

## 5. DISCUSSÃO

A infecção por *L. longbeachae* causa uma forma grave de pneumonia adquirida em seres humanos, resultando na hospitalização e, em alguns casos, no óbito de indivíduos (MONDINO et al., 2020). Embora os casos de infecção por essa bactéria sejam mais comuns na Austrália e Nova Zelândia, sua incidência está em ascensão em todo o mundo, inclusive na Europa e em partes da Ásia (CURRIE; BEATTIE, 2015; WHILEY; BENTHAM, 2011). As manifestações clínicas das infecções por *L. pneumophila* e *L. longbeachae* são semelhantes, mas tais espécies apresentam características distintas em relação aos nichos ambientais, rotas de transmissão, epidemiologia, bem como em suas características fisiológicas e genéticas (CAZALET et al., 2010; CHAMBERS et al., 2021; MONDINO et al., 2020). *L. longbeachae*, por exemplo, não codifica genes para flagelina e possui uma cápsula polissacarídica (CAZALET et al., 2010). Ao contrário de *L. pneumophila*, os mecanismos imunológicos responsáveis pela eliminação de *L. longbeachae*, como a ativação dos inflamassomas, ainda não foram explorados.

Nosso estudo mostra que a infecção por *L. longbeachae* desencadeia a ativação dos inflamassomas, culminando na clivagem de GSDMD e na liberação de IL-1 $\beta$  e LDH em macrófagos (Figura 2). Vale ressaltar que essa ativação é dependente do sistema de secreção Dot/Icm. Desse modo, o T4SS desempenha um papel dual na infecção, sendo crucial para a sobrevivência e replicação de *L. longbeachae*, além de possibilitar a ativação das vias de imunovigilância do hospedeiro por meio do reconhecimento das proteínas efetoras transduzidas para o citosol pelos PRRs (COPENHAVER et al., 2014; DOLINSKY et al., 2014).

Embora as bactérias não flageladas, *L. longbeachae* e *flaA<sup>-</sup> Lpn*, clivam de forma semelhante a GSDMD, observamos que *L. longbeachae* induz uma formação de poros reduzida na membrana celular e, conseqüentemente, menor liberação de LDH e IL-1 $\beta$  (Figura 2). Com isso, acredita-se que *L. longbeachae* regula de maneira distinta os eventos de piroptose em comparação à *flaA<sup>-</sup> Lpn*. É possível que os fatores de virulência de *L. longbeachae* possam modular as vias de reparo celular, impedindo ou retardando a ruptura da célula para que seu ciclo de vida se complete. Essa suposição se baseia na existência de mecanismos distintos nas células para reparar a membrana plasmática (ANDREWS; ALMEIDA; CORROTTE, 2014). Estudos



anteriores evidenciaram que a maquinaria ESCRT-III é capaz de remover poros na membrana formados durante a necroptose e a piroptose (GONG et al., 2017; LI et al., 2022). Além disso, a Caspase-7 também foi identificada como capaz de impedir a funcionalidade dos poros de GSDMD, ativando a esfingomielinase ácida para produzir ceramida e realizar o reparo (NOZAKI et al., 2022). Outro mecanismo que poderia ser regulado por essa bactéria para prolongar a sua sobrevivência na célula hospedeira, seria o bloqueio do executor terminal da ruptura da membrana plasmática durante a piroptose, o NINJ1 (DIAS; HORNUNG; NYLANDSTED, 2022; KAYAGAKI et al., 2021). Portanto, investigar a relevância de NINJ1 durante a infecção por *L. longbeachae* é crucial para compreender como essa bactéria intracelular manipula as respostas do hospedeiro.

Além disso, a observação de uma menor secreção e clivagem de IL-1 $\beta$  em BMDMs infectados por *L. longbeachae* em comparação à cepa *flaA*<sup>-</sup> *Lpn* está em concordância com dados da literatura, os quais indicam uma redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias em BMDMs e macrófagos humanos (MASSIS et al., 2017). Por isso, *L. longbeachae* foi caracterizada como uma bactéria de perfil mais silencioso (MASSIS et al., 2017). Essa resposta atenuada pode estar relacionada à presença da cápsula ou a outros fatores de virulência exclusivos de *L. longbeachae*. Vale ressaltar que *L. longbeachae* apresenta um repertório único de substratos para o sistema de secreção Dot/Icm tipo IV, os quais ainda não foram explorados quanto aos seus papéis na virulência dessa bactéria (CAZALET et al., 2010).

Demonstramos aqui que a clivagem de GSDMD é predominantemente mediada pelo reconhecimento do LPS bacteriano pela Caspase-11. Como resultado, os poros formados na membrana desencadeiam o efluxo de K<sup>+</sup>, ativando o inflamassoma de NLRP3, o que, por sua vez, propicia a clivagem e liberação de IL-1 $\beta$  (Figura 2) (DOWNS et al., 2020). Essa via de inflamassoma também é ativada em macrófagos infectados por bactérias clinicamente importantes, como *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *L. pneumophila*, entre outras (KAYAGAKI et al., 2011, 2015). Embora *L. longbeachae* induza a ativação do inflamassoma não-canônico de NLRP3, observamos que a Caspase-11 não é importante para o controle em macrófagos (Figura 4A e 4B). Esse resultado sugere que os macrófagos não são as principais células envolvidas no controle de *L. longbeachae*. Estudos anteriores revelaram que, em camundongos, há um grande infiltrado de neutrófilos no início da

infecção e, na fase mais tardia, as células predominantes são as moDCs (ATAIDE et al., 2023; MASSIS et al., 2017). As moDCs tornam-se as principais células produtoras de citocinas pró-inflamatórias nesse estágio da infecção (ATAIDE et al., 2023). No entanto, as contribuições claras das moDCs na restrição do nicho replicativo permanecem obscuras. Uma hipótese é que a sinalização de IFN- $\gamma$  produzido por outras células imunológicas, como as NK, nas moDCs poderia levar a morte celular das células infectadas de forma dependente de Caspase-8 (SIMPSON et al., 2022; SPÖRRI et al., 2006). Portanto, há a necessidade de caracterizar as principais células e os seus mecanismos ação no controle de *L. longbeachae*.

Outro aspecto relevante que demonstramos é que tanto a Caspase-11 quanto a Caspase-1 não desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro contra *L. longbeachae in vivo* (Figuras 6A-C, 7B). Resultados anteriores, destacados por Pereira et al. (2011), já sugeriam que a Caspase-1 e -11 não contribuía para a resistência bacteriana (PEREIRA et al., 2011a). No entanto, observamos que, na ausência dessas caspases, há um aumento significativo no dano tecidual (Figura 7A). Nesse sentido, embora não figurem como o mecanismo principal de controle, é possível que desempenhem um papel colaborativo para manter um equilíbrio adequado na resposta imunológica.

Observamos que a maquinaria dos inflamassomas AIM2 e, principalmente, NLRP3 é formada no citosol dos BMDMs (Figura 4). Acreditamos ainda que a ativação de AIM2 pode cooperar para a amplificação da atividade do inflamassoma de NLRP3 por meio do aumento do efluxo de K<sup>+</sup> nos macrófagos, uma vez que na ausência de *Aim2*<sup>-/-</sup> houve menor formação de puncta de NLRP3 do que nos BMDMs controle (Figura 4C). Estudos apontam que diferentes sensores e caspases podem ser recrutados para um único complexo de inflamassoma (KARKI et al., 2015; MAN et al., 2014). No entanto, não investigamos se esses inflamassomas podem se colocalizar durante a infecção por *L. longbeachae*.

Além disso, nossos dados suportam a hipótese de que o inflamassoma de AIM2 não é importante para o controle tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Figura 5C e 6B). Esse inflamassoma é ativado por meio do reconhecimento de dsDNA no citosol das células (WANG et al., 2020). Em contraste, a bactéria Gram-negativa, *Francisella tularensis*, que é o agente causador de tularemia, desencadeia a ativação de AIM2 em BMDMs

e em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs), sendo importante para a proteção do hospedeiro (BELHOCINE; MONACK, 2012; FERNANDES-ALNEMRI et al., 2010). A relevância do inflamassoma AIM2 também foi examinada em outras infecções bacterianas, como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Mycobacterium species*, *Brucella abortus*, *Chlamydia muridarum* e *L. pneumophila* (SHARMA; KARKI; KANNEGANTI, 2019). No entanto, vários microrganismos desenvolveram mecanismos específicos para evitar a ativação desta via de resposta inata, como por meio da expressão de proteínas que preservam a integridade dos fagossomos (SHARMA; KARKI; KANNEGANTI, 2019). Por exemplo, *L. pneumophila* secreta a proteína efetora, SdhA, a qual previne a liberação de DNA bacteriano no citosol de macrófagos ao manter a integridade da membrana do LCV (GE et al., 2012). Dessa forma, não seria surpreendente se *L. longbeachae* também empregasse mecanismos semelhantes para reprimir a ativação do inflamassoma AIM2.

A compreensão da regulação da resposta imune *in vivo* pelos inflamassomas é um desafio complexo. Dessa maneira, investigamos se a piroptose desencadeada pelas vias dos inflamassomas contribui para o recrutamento de neutrófilos. Isso se deve ao fato de que, após a ruptura das células, ocorre o extravasamento do conteúdo citoplasmático, como liberação de DAMPs, citocinas e quimiocinas, os quais propiciam a disseminação da resposta inflamatória (JORGENSEN et al., 2016b; WANG et al., 2017). Todavia, observamos que o recrutamento de neutrófilos para os pulmões de animais infectados por *L. longbeachae* ocorre de maneira independente do inflamassoma. Outra consequência da ativação das vias de inflamassomas é a liberação de IL-18, particularmente importante para induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células NK, bem como para polarizar a resposta dos linfócitos T em direção a Th1 (WAWROCKI; DRUSZCZYNSKA, 2017). No entanto, os nossos resultados mostram que essa citocina também é dispensável para o controle de *L. longbeachae*.

Nossos dados mostram que o inflamassoma de NLRP3 desempenha um papel crucial no controle tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta observação contrasta com a falta de suscetibilidade evidenciada na ausência de Asc/Casp-1 e -11, sugerindo, assim, a possibilidade de que NLRP3 possa exercer funções independentes dessas proteínas. Em camundongos, NLRP3 e ASC, mas não Caspase-1/11, protegem o hospedeiro da infecção por *Streptococcus pneumoniae* por meio da regulação de genes relacionados à defesa da mucosa nas vias aéreas, como TFF2, REG3 $\gamma$  e BPIFA1 (FANG et al., 2019).

Outro trabalho, por sua vez, mostrou que o NLRP3 tem efeito na função da barreira epitelial pulmonar de forma independente de IL-18, IL-1 $\beta$ , Caspase-1 e ASC (KOSTADINOVA et al., 2016). Portanto, estudos prospectivos que se dedicam à elucidação dos genes regulados por NLRP3 durante a infecção por *L. longbeachae*, bem como a avaliação da integridade da barreira pulmonar, contribuirão para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos específicos subjacentes ao papel de NLRP3.

Adicionalmente, nossos dados revelam que a GSDMD é importante para a resistência à infecção em camundongos, mas que os macrófagos não são as principais células responsáveis por essa resposta (Figura 5D-E; 6A). Em contraste com *L. pneumophila*, na qual a piroptose em macrófagos está associada à eliminação do nicho replicativo ou à formação de detritos celulares denominados PITs, que aprisionam as bactérias previamente intracelulares e facilitam a captação por neutrófilos (GONÇALVES et al., 2019; JORGENSEN et al., 2016b; MASCARENHAS et al., 2017; PEREIRA et al., 2011a). Além do seu papel em macrófagos, a função da GSDMD em outras células, como neutrófilos e células epiteliais, tem sido cada vez mais investigada. Por exemplo, Zhang et al. (2022) demonstraram a função intrínseca da GSDMD na exocitose dos grânulos de mucina em células caliciformes (ZHANG et al., 2022). Em neutrófilos, a GSDMD pode contribuir para a liberação de armadilhas extracelulares denominadas NETs, de forma dependente ou independente dos inflamassomas (CHEN et al., 2018; SOLLBERGER et al., 2018). Dessa forma, a GSDMD também parece desempenhar papéis diversos na contenção da replicação de *L. longbeachae*.

Além das Caspases-1 e -11, a GSDMD pode ser clivada pela Caspase-8 para desencadear a piroptose (DEMARCO et al., 2020; ORNING et al., 2018; ZHENG et al., 2021). A Caspase-8 é classificada como uma caspase apoptótica e inflamatória; e possui um domínio DED. Assim como a Caspase-1, é ativada por dimerização, e a sua forma ativa consiste em duas grandes subunidades p18 e duas pequenas subunidades p10 (ORNING; LIEN, 2021). Embora seja mais reconhecida como um ativador da Caspase-3, comumente associada à regulação da morte celular por apoptose, essa proteína também está relacionada a respostas inflamatórias em diferentes infecções bacterianas (ORNING et al., 2018; ORNING; LIEN, 2021). Por exemplo, macrófagos infectados com *L. pneumophila*, quando na ausência de

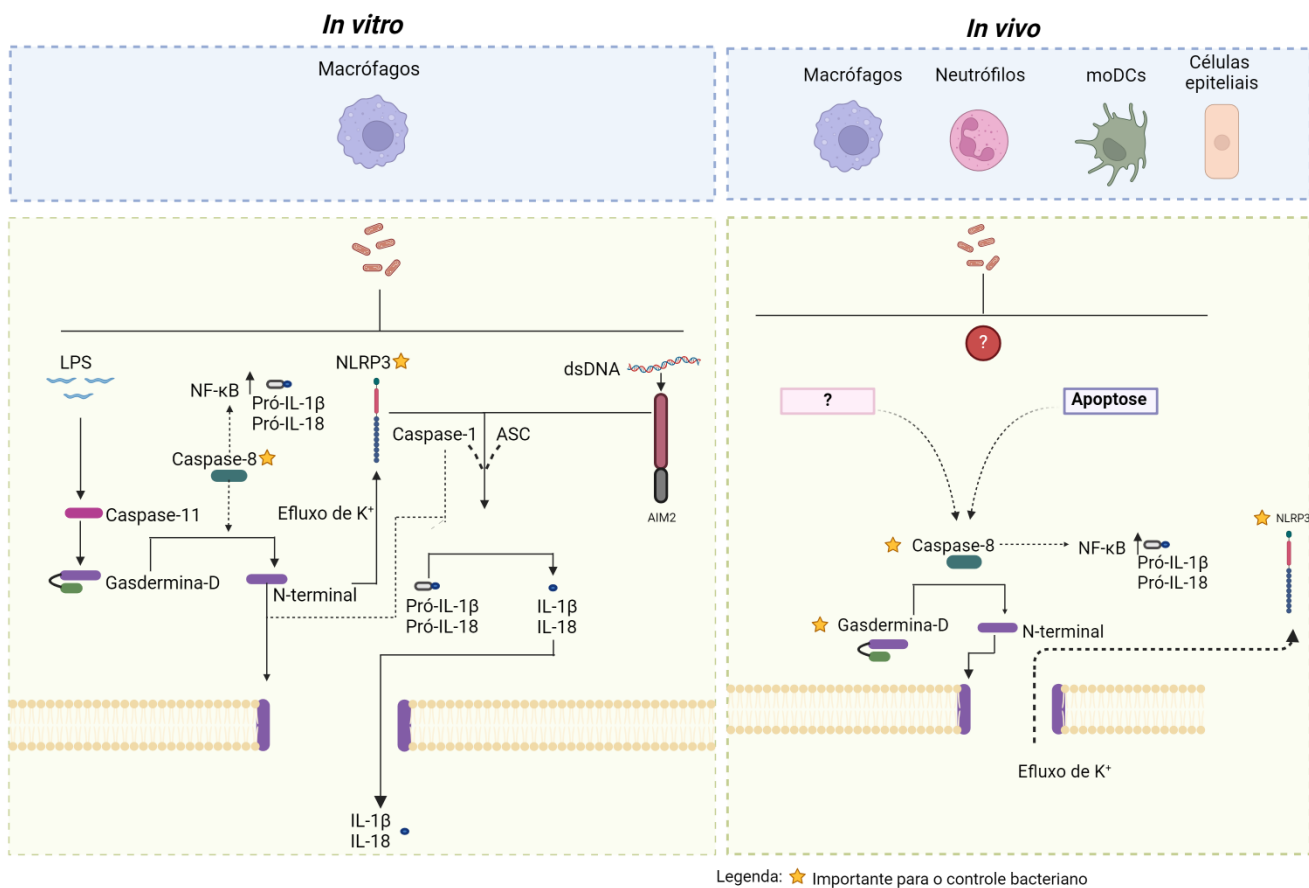
Caspase-1 e GSDMD, ativa uma via alternativa do inflamassoma de NAIP5/NLRC4 que recruta a Caspase-8 e resulta na morte da célula hospedeira de forma independente de GSDMD (GONÇALVES et al., 2019; MASCARENHAS et al., 2017). Além disso, a ativação de Caspase-8 pode desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3 (VINCE; SILKE, 2016). Um estudo realizado com *Yersinia* demonstrou que a sua molécula efetora YopJ inibe a sinalização da quinase TAK1 e, conseqüentemente, recruta um complexo envolvendo FADD-RIPK1-Caspase-8. Esse complexo, por sua vez, ativa a Caspase-8 e leva à piroptose (ORNING et al., 2018; ZHENG et al., 2021).

Portanto, formulamos a hipótese que a Caspase-8 também poderia clivar a GSDMD durante a infecção por *L. longbeachae*. De forma interessante, identificamos, pela primeira vez, uma via crucial para o controle de *L. longbeachae*, dependente tanto de Caspase-8 quanto de GSDMD, em um modelo murino (Figuras 8A e 8B). Por último, vimos também que os BMDMs *Casp8/ripk3*<sup>-/-</sup> são mais suscetíveis a infecção, mas esse fenótipo não sugere ser dependente de GSDMD, tendo em vista que os BMDMs *Gsdmd*<sup>+/-</sup> não apresentaram um aumento na replicação bacteriana. Uma possível explicação para esse achado é que em macrófagos a Caspase-8 pode estar mais associada à ativação de NF-κB, fator de transcrição importante na ativação de genes que codificam citocinas, por exemplo (SU et al., 2005; WENG et al., 2014). Dessa forma, estudos futuros podem se beneficiar dessas descobertas para aprofundar a compreensão da via Caspase-8/GSDMD no controle de bactérias que causam pneumonia, uma preocupação significativa em termos de saúde pública.

## 6. CONCLUSÕES

Neste estudo, investigamos a capacidade de *L. longbeachae* ativar diferentes vias de inflamassomas e sua relevância na defesa do hospedeiro contra a replicação bacteriana. Os resultados revelam que *L. longbeachae* predominantemente ativa o inflamassoma não-canônico de NLRP3 a partir do reconhecimento do LPS bacteriano pela Caspase-11 em macrófagos (Figura 9). De forma interessante, Caspase-11 e Caspase-1 mostraram-se dispensáveis para o controle bacteriano *in vitro* e *in vivo*. NLRP3 exibiu um efeito protetor independente de inflamassomas. Além disso, identificamos uma via crucial para o controle de *L. longbeachae*, na qual GSDMD e Caspase-8 desempenham papéis fundamentais em modelo murino (Figura 9). Uma investigação mais aprofundada dessa via poderá revelar alvos medicamentosos relevantes contra bactérias que causam pneumonia.

Figura 9 - Modelo proposto de mecanismos da resposta imunológica durante à infecção por *L. longbeachae*.



Fonte: Da autora (2024). Imagem criada com o [BioRender.com](https://www.biorender.com).

## REFERÊNCIAS

- AACHOUI, Y. et al. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. **Current Opinion in Microbiology**, 2013.
- ALURI, J.; COOPER, M. A.; SCHUETTPELZ, L. G. Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system. **Cells**, 2021.
- ANDRADE, W. A.; ZAMBONI, D. S. NLR4 biology in immunity and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020.
- ANDREWS, N. W.; ALMEIDA, P. E.; CORROTTE, M. Damage control: Cellular mechanisms of plasma membrane repair. **Trends in Cell Biology**, 2014.
- ARCHER, K. A. et al. Multiple MyD88-dependent responses contribute to pulmonary clearance of *Legionella pneumophila*. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 1, 2009.
- ARCHER, K. A.; ROY, C. R. MyD88-dependent responses involving Toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of legionella pneumophila in a mouse model of Legionnaires' disease. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, 2006.
- ASARE, R. et al. Genetic susceptibility and caspase activation in mouse and human macrophages are distinct for *Legionella longbeachae* and *L. pneumophila*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, 2007.
- ATAIDE, M. A. et al. Inflammasome activation and CCR2-mediated monocyte-derived dendritic cell recruitment restrict *Legionella pneumophila* infection. **European Journal of Immunology**, v. 53, n. 2, 2023.
- BACCALA, R. et al. Sensors of the innate immune system: Their mode of action. **Nature Reviews Rheumatology**, 2009.
- BECKERS, M. C. et al. Natural resistance to infection with *Legionella pneumophila*: chromosomal localization of the Lgn1 susceptibility gene. **Mammalian Genome**, v. 6, n. 8, 1995.
- BELHOCINE, K.; MONACK, D. M. *Francisella* infection triggers activation of the AIM2 inflammasome in murine dendritic cells. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 1, 2012.
- BERRINGTON, W. R. et al. NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 12, 2010.



BHAN, U. et al. Toll-like receptor 9 regulates the lung macrophage phenotype and host immunity in murine pneumonia caused by *Legionella pneumophila*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, 2008.

BORELLA, P. et al. Water ecology of Legionella and protozoan: Environmental and public health perspectives. **Biotechnology Annual Review**, 2005.

BOUCHER, D. et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 3, 2018.

BRIARD, B.; PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T. D. DNA sensing in the innate immune response. **Physiology**, 2020.

BROWN, A. S. et al. Cooperation between Monocyte-Derived Cells and Lymphoid Cells in the Acute Response to a Bacterial Lung Pathogen. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, 2016.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, 2016.

CASE, C. L. et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 5, 2013.

CASSON, C. N. et al. Caspase-11 Activation in Response to Bacterial Secretion Systems that Access the Host Cytosol. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

CAZALET, C. et al. Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 2, 2010.

CHAMBERS, S. T. et al. Legionellosis caused by non-legionella pneumophila species, with a focus on *Legionella longbeachae*. **Microorganisms**, 2021.

CHEN, K. W. et al. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. **Science Immunology**, v. 3, n. 26, 2018.

CODO, A. C. et al. Inhibition of inflammasome activation by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae* impairs efferocytosis and leads to bacterial dissemination. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 12, 2018.

COPENHAVER, A. M. et al. Alveolar macrophages and neutrophils are the primary reservoirs for *Legionella pneumophila* and mediate cytosolic surveillance of type IV secretion. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 10, 2014.

CREAGH, E. M. Caspase crosstalk: Integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. **Trends in Immunology**, 2014.

CREASEY, E. A.; ISBERG, R. R. The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 9, 2012.

CUNHA, B. A.; BURILLO, A.; BOUZA, E. Legionnaires' disease. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10016, p. 376–385, 23 jan. 2016.

CUNHA, L. D. et al. AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Reports**, v. 20, n. 4, 2017.

CUNHA, L. D.; ZAMBONI, D. S. Recognition of *Legionella pneumophila* nucleic acids by innate immune receptors. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 12, 2014.

CURRIE, S. L.; BEATTIE, T. K. Compost and *Legionella longbeachae*: An emerging infection? **Perspectives in Public Health**, 2015.

DEMARCO, B. et al. Caspase-8-dependent gasdermin D cleavage promotes antimicrobial defense but confers susceptibility to TNF-induced lethality. **Science Advances**, v. 6, n. 47, 2020.

DIAS, C.; HORNING, V.; NYLANDSTED, J. A novel NINJ1-mediated regulatory step is essential for active membrane rupture and common to different cell death pathways. **Faculty Reviews**, 2022.

DIETRICH, W. F. et al. Lgn1, a gene that determines susceptibility to *Legionella pneumophila*, maps to mouse chromosome 13. **Genomics**, v. 26, n. 3, 1995.

DIEZ, E. et al. The Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (Naip) Is Expressed in Macrophages and Is Modulated After Phagocytosis and During Intracellular Infection with *Legionella pneumophila*. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, 2000.

DOLINSKY, S. et al. The *Legionella longbeachae* Icm/Dot substrate SidC selectively binds phosphatidylinositol 4-phosphate with nanomolar affinity and promotes pathogen

vacuole-endoplasmic reticulum interactions. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 10, 2014.

DOWNS, K. P. et al. An overview of the non-canonical inflammasome. **Molecular aspects of medicine**, v. 76, 1 dez. 2020.

FANG, R. et al. ASC and NLRP3 maintain innate immune homeostasis in the airway through an inflammasome-independent mechanism. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 5, 2019.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, 2010.

FRASER, D. W. et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. **The New England journal of medicine**, v. 297, n. 22, 1977.

FRUTUOSO, M. S. et al. The pattern recognition receptors Nod1 and Nod2 account for neutrophil recruitment to the lungs of mice infected with *Legionella pneumophila*. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 11, 2010.

FUSE, E. T. et al. Role of Toll-like receptor 2 in recognition of *Legionella pneumophila* in a murine pneumonia model. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 305–312, mar. 2007.

GE, J. et al. Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a *Legionella* effector functioning in membrane trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, 2012.

GLICK, T. H. et al. Pontiac fever: An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. **American Journal of Epidemiology**, v. 107, n. 2, 1978.

GOBIN, I. et al. Experimental *Legionella longbeachae* infection in intratracheally inoculated mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, 2009.

GONÇALVES, A. V. et al. Gasdermin-D and caspase-7 are the key caspase-1/8 substrates downstream of the NAIP5/NLRC4 inflammasome required for restriction of legionella pneumophila. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 6, 2019.

- GONG, Y. N. et al. ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. **Cell**, v. 169, n. 2, 2017.
- GRIGORYEVA, L. S.; CIANCIOTTO, N. P. Human macrophages utilize a wide range of pathogen recognition receptors to recognize *Legionella pneumophila*, including Toll-Like Receptor 4 engaging Legionella lipopolysaccharide and the Toll-like Receptor 3 nucleic-acid sensor. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. July, 2021.
- GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, 2015.
- HARTL, D. et al. Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine. **Journal of Innate Immunity**, 2018.
- HAWN, T. R. et al. A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires' Disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 10, 2003.
- HAWN, T. R. et al. Myeloid differentiation primary response gene (88)- and toll-like receptor 2-deficient mice are susceptible to infection with aerosolized *Legionella pneumophila*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 12, 2006.
- HAWN, T. R. et al. Altered Inflammatory Responses in TLR5-Deficient Mice Infected with *Legionella pneumophila*. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 10, 2007.
- HAYWARD, J. A. et al. Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 4, 2018.
- HE, Y. et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. **Nature**, v. 530, n. 7590, 2016.
- HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends in Biochemical Sciences**, 2016.
- HO, K. S. et al. *Legionella* lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 41, n. 10, 2009.

INOHARA, N. et al. NOD-LRR proteins: Role in host-microbial interactions and inflammatory disease. **Annual Review of Biochemistry**, 2005.

JONES, J. W. et al. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, 2010.

JORGENSEN, I. et al. IL-1 $\beta$ , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 12, 2016a.

JORGENSEN, I. et al. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 10, 2016b.

JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death and Differentiation**, 2017.

KAISER, W. J. et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. **Nature**, v. 471, n. 7338, 2011.

KARKI, R. et al. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 3, 2015.

KAUFMANN, A. F. et al. Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. **American journal of epidemiology**, v. 114, n. 3, p. 337–347, 1981.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, 2010.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, 2011.

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, 2015.

KAYAGAKI, N. et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. **Nature**, v. 591, n. 7848, 2021.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

KOIDE, M. et al. Detection of *Legionella* spp. in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. **Applied and Environmental Microbiology**, 1993.

KORTMANN, J.; BRUBAKER, S. W.; MONACK, D. M. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 3, 2015.

KOSTADINOVA, E. et al. NLRP3 protects alveolar barrier integrity by an inflammasome-independent increase of epithelial cell adherence. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

KOVACS, S. B.; MIAO, E. A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. **Trends in Cell Biology**, 2017.

KOZAK, N. A. et al. Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 4, 2010.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, 2011.

LAGUNA, R. K. et al. A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 49, 2006.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, 2014.

LETTINGA, K. D. et al. Toll-like receptor 4 is not involved in host defense against pulmonary *Legionella pneumophila* infection in a mouse model. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 4, 2002.

LI, P. et al. Mice deficient in IL-1 $\beta$ -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 $\beta$  and resistant to endotoxic shock. **Cell**, v. 80, n. 3, 1995.

- LI, Z. et al. Enhancing Gasdermin-induced tumor pyroptosis through preventing ESCRT-dependent cell membrane repair augments antitumor immune response. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 2022.
- LIU, X.; SHIN, S. Viewing *Legionella pneumophila* Pathogenesis through an Immunological Lens. **Journal of Molecular Biology**, 2019.
- MALIREDDI, R. K. S. et al. Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity-independent pyroptosis, apoptosis, necroptosis, and inflammatory disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 3, 2020.
- MAN, S. M. et al. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, 2014.
- MANGAN, M. S. J. et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2018.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, 2006.
- MARIM, F. M. et al. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.
- MASCARENHAS, D. P. A. et al. Interleukin 1 receptor-driven neutrophil recruitment accounts to MyD88-dependent pulmonary clearance of *Legionella pneumophila* infection *in vivo*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, 2015.
- MASCARENHAS, D. P. A. et al. Inhibition of caspase-1 or gasdermin-D enable caspase-8 activation in the Naip5/NLRC4/ASC inflammasome. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 2017.
- MASCARENHAS, D. P. A.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome biology taught by *Legionella pneumophila* . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 4, 2017.
- MASSIS, L. M. et al. *Legionella longbeachae* is immunologically silent and highly virulent *in vivo*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 3, 2017.
- MCKINNEY, R. M. et al. *Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human pneumonia. **Annals of Internal Medicine**, v. 94, n. 6, 1981.

MEYERS, A. K.; ZHU, X. The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. **Cells**, 2020.

MIAO, E. A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nature Immunology**, v. 11, n. 12, 2010.

MIYASHITA, N. et al. Distribution of Legionella species and serogroups in patients with culture-confirmed Legionella pneumonia. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 5, 2020.

MONDINO, S. et al. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 2020.

MONTANARO-PUNZENGRUBER, J. C. et al. Australian isolates of *Legionella longbeachae* are not a clonal population. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, 1999.

MURDOCH, D. R. Diagnosis of *Legionella* infection. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 36, n. 1, p. 64–69, 1 jan. 2003.

NEWTON, C. A. et al. Role of Toll-like receptor 9 in *Legionella pneumophila*-induced interleukin-12 p40 production in bone marrow-derived dendritic cells and macrophages from permissive and nonpermissive mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 1, 2007.

NEWTON, H. J. et al. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. **Clinical Microbiology Reviews**, 2010.

NISAR, M. A. et al. Molecular screening and characterization of *Legionella pneumophila* associated free-living amoebae in domestic and hospital water systems. **Water Research**, v. 226, 2022.

NOZAKI, K. et al. Caspase-7 activates ASM to repair gasdermin and perforin pores. **Nature**, v. 606, n. 7916, 2022.

ORNING, P. et al. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8–dependent cleavage of gasdermin D and cell death. **Science**, v. 362, n. 6418, 2018.



ORNING, P.; LIEN, E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, 2021.

PANDEY, A. et al. Cell biology of inflammasome activation. **Trends in Cell Biology**, 2021.

PARK, B. et al. Innate immunity against *Legionella pneumophila* during pulmonary infections in mice. **Archives of Pharmacal Research**, 2017.

PEREIRA, M. S. F. et al. The Nlr4 inflammasome contributes to restriction of pulmonary infection by flagellated *Legionella* spp. that trigger pyroptosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. FEB, 2011a.

PEREIRA, M. S. F. et al. Activation of NLRC4 by Flagellated Bacteria Triggers Caspase-1–Dependent and –Independent Responses To Restrict *Legionella pneumophila* Replication in Macrophages and In Vivo . **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, 2011b.

PHIN, N. et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. **The Lancet Infectious Diseases**, 2014.

PLATNICH, J. M.; MURUVE, D. A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2019.

RAUCH, I. et al. NAIP-NLRC4 Inflammasomes Coordinate Intestinal Epithelial Cell Expulsion with Eicosanoid and IL-18 Release via Activation of Caspase-1 and -8. **Immunity**, v. 46, n. 4, 2017.

ROSS, C. et al. Inflammatory Caspases: Toward a Unified Model for Caspase Activation by Inflammasomes. **Annual Review of Immunology**, 2022.

RUEHLEMANN, S. A.; CRAWFORD, G. R. Panic in the potting shed: The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. **Medical Journal of Australia**, v. 164, n. 1, 1996.

SCHMID-BURGK, J. L. et al. A genome-wide CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) screen identifies NEK7 as an essential component of NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 1, 2016.

SCHWAKE, D. O.; ALUM, A.; ABBASZADEGAN, M. *Legionella* occurrence beyond cooling towers and premise plumbing. **Microorganisms**, 2021.

SHARMA, B. R.; KARKI, R.; KANNEGANTI, T. D. Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. **European Journal of Immunology**, 2019.

SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **Journal of Cell Biology**, 2016.

SHI, H. et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. **Nature Immunology**, v. 17, n. 3, 2016.

SHIN, S. et al. Type IV secretion-dependent activation of host MAP kinases induces an increased proinflammatory cytokine response to *Legionella pneumophila*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, 2008.

SILVEIRA, T. N.; ZAMBONI, D. S. Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, 2010.

SIMPSON, D. S. et al. Interferon- $\gamma$  primes macrophages for pathogen ligand-induced killing via a caspase-8 and mitochondrial cell death pathway. **Immunity**, v. 55, n. 3, 2022.

SOLLBERGER, G. et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. **Science Immunology**, v. 3, n. 26, 2018.

SPÖRRI, R. et al. MyD88-Dependent IFN- $\gamma$  Production by NK Cells Is Key for Control of *Legionella pneumophila* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 10, 2006.

STEELE, T. W.; MCLENNAN, A. M. Infection of tetrahymena pyriformis by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, 1996.

SU, H. et al. Requirement for caspase-8 in NF- $\kappa$ B activation by antigen receptor. **Science**, v. 307, n. 5714, 2005.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, 2019.

- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, 2010.
- VAN OPDENBOSCH, N.; LAMKANFI, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. **Immunity**, 2019.
- VINCE, J. E.; SILKE, J. The intersection of cell death and inflammasome activation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2016.
- WANG, B. et al. Immunobiology and structural biology of AIM2 inflammasome. **Molecular Aspects of Medicine**, 2020.
- WANG, H. et al. MAIT cells protect against pulmonary *Legionella longbeachae* infection. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- WANG, J. et al. Caspase-11 deficiency impairs neutrophil recruitment and bacterial clearance in the early stage of pulmonary *Klebsiella pneumoniae* infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, 2017.
- WANG, X. et al. ALK-JNK signaling promotes NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis via NEK7 during *Streptococcus pneumoniae* infection. **Molecular Immunology**, 2023.
- WAWROCKI, S.; DRUSZCZYNSKA, M. Inflammasomes in mycobacterium tuberculosis-driven immunity. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 2017.
- WENG, D. et al. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, 2014.
- WHILEY, H.; BENTHAM, R. *Legionella longbeachae* and legionellosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, 2011.
- WIGGINS, K. A. et al. IL-1 $\alpha$  cleavage by inflammatory caspases of the noncanonical inflammasome controls the senescence-associated secretory phenotype. **Aging Cell**, v. 18, n. 3, 2019.

WOOD, R. E. et al. Dot/Icm effector translocation by *Legionella longbeachae* creates a replicative vacuole similar to that of *Legionella pneumophila* despite translocation of distinct effector repertoires. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, 2015.

XUE, Y. et al. Emerging Activators and Regulators of Inflammasomes and Pyroptosis. **Trends in Immunology**, 2019.

YAMAMOTO, Y. et al. Growth of *Legionella pneumophila* in Thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 2, 1988.

YANG, J. et al. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 35, 2013.

YU, V. L. et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 1, 2002.

ZAMBONI, D. S. et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. **Nature Immunology**, v. 7, n. 3, 2006a.

ZAMBONI, D. S. et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. **Nature immunology**, v. 7, n. 3, p. 318–325, mar. 2006b.

ZHANG, J. et al. Epithelial Gasdermin D shapes the host-microbial interface by driving mucus layer formation. **Science Immunology**, v. 7, n. 68, 2022.

ZHENG, Z. et al. The lysosomal Rag-Ragulator complex licenses RIPK1- And caspase-8-mediated pyroptosis by *Yersinia*. **Science**, v. 372, n. 6549, 2021.

## ANEXO

ANEXO A – Artigo publicado durante o mestrado


Trabalho em colaboração (ATAIDE, M. A.; MANIN, G.Z.; OLIVEIRA, S. S.; GUERRA, R.O. AND ZAMBONI, D. S. *European Journal of Immunology*, 2023. Doi: 10.1002/eji.202249985).

Title: “Inflammasome activation and CCR2-mediated monocyte-derived dendritic cell recruitment restrict *Legionella pneumophila* infection.”

Publicado em: fevereiro de 2023

## Research Article

# Inflammasome activation and CCR2-mediated monocyte-derived dendritic cell recruitment restrict *Legionella pneumophila* infection

Marco A. Ataíde, Grazielle Z. Manin, Samuel S. Oliveira, Rhanoica O. Guerra and Dario S. Zamboni 

Department of Cell Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Flagellin-induced NAIP/NLRC4 inflammasome activation and pyroptosis are critical events restricting *Legionella pneumophila* infection. However, the cellular and molecular dynamics of the *in vivo* responses against this bacterium are still unclear. We have found temporal coordination of two independent innate immunity pathways in controlling *Legionella* infection, the inflammasome activation and the CCR2-mediated Mo-DC recruitment. Inflammasome activation was an important player at the early stage of infection by lowering the numbers of bacteria for an efficient bacterial clearance conferred by the Mo-DC at the late stage of the infection. Mo-DC emergence highly depended on CCR2-signaling and dispensed inflammasome activation and pyroptosis. Also, Mo-DC compartment did not rely on the inflammasome machinery to deliver proper immune responses and was the most abundant cytokine-producing among the monocyte-derived cells in the infected lung. Importantly, when the CCR2- and NLRC4-dependent axes of response were simultaneously ablated, we observed an aggravated bacterial burden in the lung of infected mice. Taken together, we showed that inflammasome activation and CCR2-mediated immune response interplay in distinct pathways to restrict pulmonary bacterial infection. These findings extend our understanding of the *in vivo* integration and cooperation of different innate immunity arms in controlling infectious agents.

**Keywords:** CCR2 · innate immunity · *Legionella* · monocyte-derived dendritic cell · NLRC4-inflammasome

## Introduction

The Innate Immune responses play a critical role in the lymphoid and non-lymphoid tissues in the early phase of infections by recognizing and containing microbes and pathogens [1, 2]. The lung is an important site of infection for several clinically relevant pathogens, including viruses and bacteria, where the innate immune responses play a pivotal role in maintaining the periph-

eral tissue homeostasis [3]. The response against *Legionella pneumophila* infection is a typical example of the importance of innate immunity in that tissue. *L. pneumophila* infection is generally controlled by innate immunity, although it can still cause severe pneumonia, known as Legionnaires' disease, if early bacterial replication is not restricted [4, 5]. Therefore, a better understanding of the successful innate immune responses during *Legionella in vivo* infection could illuminate the molecular and cellular interplay controlling the pulmonary bacterial insult.

*L. pneumophila* has been used as a valuable tool to dissect the molecular mechanisms of inflammasome activation and its effector molecules [6]. Inflammasomes are multiprotein platforms

Correspondence: Dr. Dario S. Zamboni  
e-mail: dszamboni@fmrp.usp.br