

CARINA BUZZO DE LIMA

**Participação dos receptores do tipo Nod na
ativação da iNOS em macrófagos estimulados
com flagelina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências
(Imunologia).

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARINA BUZZO DE LIMA

**Participação dos receptores do tipo NOD na
ativação da iNOS por macrófagos estimulados
com flagelina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr^a. Karina Ramalho Bortoluci

São Paulo

2009

***Dedico este trabalho aos meus AMIGOS e colaboradores,
Alexandra, Rafael, Júlia e Liliana, por contribuírem para a finalização do
mesmo. Obrigada pelo incentivo, por todas as discussões, pelo o apoio
durante os experimentos e pela amizade e confiança que se criou.
Agradeço em especial à Júlia por muitas vezes deixar suas próprias
tarefas para me ajudar nos experimentos, principalmente nesta etapa
final. Muito Obrigada!!!***

AGRADECIMENTOS

Obrigada à todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

À minha família, por me educar e por estar presente em todas as horas, obrigada por todo o auxílio e dedicação e por todo o apoio durante esses anos de estudos.

Ao meu querido Bruno, por despertar em mim o amor pela imunologia a partir de uma imunodeficiência, pelo apoio incondicional, pela compreensão e por todo incentivo, o qual me fez chegar até aqui. Muito Obrigada por tudo!!!

À minha orientadora e amiga Karina Bortoluci, pessoa responsável por minha formação, obrigada por pegar nas minhas mãos e me ensinar tudo o que eu sei hoje. Obrigada por antes de orientadora, ter sido minha amiga e muitas vezes ter sido uma MãE. Obrigada por suas palavras de conforto e por estar ao meu lado em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins.

Ao Profº Momtchilo Russo, por quem sinto grande carinho, obrigada por ter aberto as portas do laboratório permitindo meu estágio com a Karina. Obrigada por todas as conversas e discussões imunológicas que com certeza ajudaram no meu desenvolvimento durante esta fase. Obrigada também por ter sido meu amigo sempre que precisava.

Aos amigos do laboratório do Profº Momtchilo, Érica, Esther, Lucas, Juciane, Juliana, Karina Carla, David, Renato, Lili, PC e Aninha por terem me ajudado intensamente e por terem tornado a rotina de trabalho mais feliz. TODOS vocês são muito especiais para mim.

Ao Profº Gustavo por todo apoio e por ter me recebido em seu laboratório para realização de alguns experimentos para finalização desta dissertação.

Ao amigos do laboratório do Profº Gustavo, Ricardo, Welbert, Daniel, Aninha, Moki, Janine, Claudinha, Jackie, Julia, Maíra, Débora, Maria Emília, Lu, Lu Medina e Tiago por me receberem de braços abertos no laboratório, me ajudando sempre que necessário. Agradeço em especial ao Ricardo, pela atenção e pela prontidão em me ajudar e por todas as discussões dos meus resultados, muito obrigada.

À Profª ISES, por ter nos aceitado em seu laboratório para que pudéssemos dar continuidade em nossos projetos. Agradeço também à Inêz e a Marilu por toda atenção e ajuda nesses poucos meses de trabalho juntas.

Ao amigo e colaborador Profº Dario Zamboni, por me receber em seu laboratório na USP-RP, permitindo a utilização dos camundongos knockouts para a realização dos experimentos. Agradeço também à todos os alunos do laboratório pela atenção durante minha estada, em especial à Eulália e a Larissa por terem cedido suas casas durante o período em que estive lá.

À Eni, por quem tenho grande afeto e carinho, obrigada por ter me transmitido paz no dia da prova de ingresso no mestrado, fazendo com que eu pudesse ter calma na resolução das questões.

Ao Amarildo, por todas as dúvidas tiradas e por todo apoio sempre que precisei.

À banca examinadora, por ter aceitado meu convite para participação deste trabalho e deste dia tão especial.

À todos vocês, MUITO OBRIGADA!!!

“Procure ser uma pessoa de valor ao invés de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só uma consequência....”

(Albert Einstein)

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Buzzo CL. Papel dos receptores do tipo Nod na ativação da iNOS em macrófagos estimulados com flagelina [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O sistema imune inato dispõe de receptores para o reconhecimento de padrões moleculares (PRR- *Pattern Recognition Receptors*) nos compartimentos extra e intracelulares, capazes de detectar estruturas frequentemente presentes em patógenos (PAMPS – *Pathogen associated molecular patterns*), como a flagelina. O reconhecimento da flagelina, subunidade constituinte do flagelo de bactérias móveis, parece ser compartilhado pelo receptor transmembrânico do tipo Toll 5 (*Toll Like Receptor 5* – TLR5) e membros dos receptores citosólicos do tipo NOD (*NOD Like Receptors* – NLR), Ipaf e Naip5. Sabe-se que o TLR5 é capaz de ativar diversos genes inflamatórios pela via MYD88-NF- κ B, enquanto Ipaf e Naip5 parecem constituir complexos denominados inflamassomas que culminam na ativação de caspase-1, cisteíno-protease necessária para a maturação e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. Assim, o reconhecimento de um único PAMP pode gerar respostas efetoras distintas, porém pouco ainda é conhecido da contribuição relativa desses receptores para a ativação de macrófagos (M ϕ). Para avaliar as conseqüências do reconhecimento extra e intracelular da flagelina, M ϕ peritoneais (MP) e derivados de medula óssea (MDMO) foram estimulados com flagelina purificada das bactérias gram negativa *S. typhimurium* e gram positiva *Bacillus subtilis* em sua forma livre (FliC) ou inserida em vesículas lipídicas catiônicas DOTAP (FliCDot), que permitem a entrega do agonista no citosol celular (0,6 μ g de proteína/ 5×10^5 cels). Como esperado, o estímulo com FliCDot de ambas as flagelinas induziu a secreção de altos níveis de IL-1 β , de maneira dependente da ativação de caspase-1, uma vez que a adição de Z-YVAD reduziu significativamente esses níveis. No entanto, tanto FliC como FliCDot foram capazes de induzir a expressão da iNOS, enzima responsável pela geração de óxido nítrico, fundamental no controle de diversos patógenos. Uma vez que o promotor gênico da iNOS contém sítios de ligação para os fatores de transcrição NF- κ B e IRF-1 (*Interferon responsive factor-1*), sua ativação por FliC pode ser alcançada pela via TLR5-MYD88-NF- κ B. Porém, surpreendentemente, a ativação da iNOS por FliCDot se mostrou dependente de caspase-1, um efeito até então desconhecido. E, a ativação de iNOS por FliCDot parece envolver também o sítio de NF- κ B, uma vez que o mesmo parece ser ativado em sua presença, assim como de FliC. Finalmente, a avaliação de MDMO de animais *knockouts* para Ipaf e mutantes para Naip5 (A/J e Naip5^{AJ/AJ}) sugeriu o envolvimento de ambos os receptores na ativação da iNOS. A participação de Naip5 foi ainda mais evidente uma vez que a expressão de iNOS induzida por FliCDot foi completamente abolida nos animais mutantes para esse gene. Os dados em conjunto, nos permitem especular que Naip5 e Ipaf estariam envolvidos no reconhecimento da flagelina

citossólica e consequente ativação da caspase-1 que, por sua vez, seria capaz de induzir a expressão de iNOS por um mecanismo aparentemente envolvendo NF- κ B.

Palavras-chave: Macrófagos; Receptores do tipo Toll; Receptores do tipo Nod; Flagelina; iNOS; Caspase-1.

ABSTRACT

Buzzo CL. The role of Nod-like receptors on iNOS activation in flagellin-stimulated macrophages [Master thesis (Immunology)]. São Paulo: Biomedic Science Institute, University of Sao Paulo; 2009.

The innate immune system is composed intra and extracellular by *Pattern Recognition Receptors* (PRR), which can recognize standard structures, as the flagellin, present in pathogens - *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPS). The recognition of flagellin, subunit of flagellum, may seem to be shared by the transmembranic *Toll Like Receptor 5* (TLR5) and some members of the cytosolic *Nod-Like Receptors* (NLR), Ipaf e Naip5. It is known that the TLR5 is able to activate some inflammatory genes through the MYD88-NF- κ B pathway, while Ipaf and Naip5 seem to constitute inflammasomes which lead in the caspase-1 activation, a necessary protease to mature and secrete pro inflammatory cytokines like IL-1 β e IL-18. Therefore, the recognition of a single PAMP can generate distinct effector answers, although it is not much aware yet the relative contribution of these receptors when activating macrophages (M \emptyset). In order to evaluate the responses to the extra and intracellular recognition of flagellin, peritoneal M \emptyset and those Bone Marrow Derived (MDMO) were stimulated with purified flagellin from gram negative bacteria *S. typhimurium* and gram positive *Bacillus subtilis*, in its free form (FliC) or inserted in cationic lipid vesicles DOTAP (FliCDot). This last form, allows the agonist delivery to the cytosolic compartment (0, 6 μ g proteins/5x10⁵ cells). As expected, the stimulus with FliCDot from both bacterial flagellins induced high IL-1 β secretion levels dependent of caspase-1 activation, which were dramatically reduced when added Z-YVAD to the medium. Both FliC and FliCDot were able to induce iNOS expression, enzyme responsible for Nitric Oxide (NO) production, which is an important molecule for pathogens control. The iNOS gene promoter has some binding sites for the transcription factors NF- κ B and IRF-1 (*Interferon responsive factor-1*) and its activation by FliC can be reached by the TLR5-MYD88-NF- κ B pathway. However, surprisingly, iNOS activation by FliCDot was caspase-1 dependent, an undescribed effect up to know. iNOS activation by FliCDot seems to be related also to the NF- κ B sites as it is activated in its presence, and also FliC. Finally, evaluating MDMO from Ipaf *knockout* animals and Naip5 (A/J e Naip5^{AJ/AJ}) mutant ones suggested that both flagellin presentations are involved in iNOS activation. Naip5 participation was more clearly seen when iNOS expression induced by FliCDot was completely abolished in mutant animals for this gene. The complete view of all the data allow us to speculate that Naip5 e Ipaf would be involved in the recognition of cytosolic flagellin and as a consequence, caspase-1 activation. This last one would be able to induce iNOS expression by a mechanism apparently involving NF- κ B.

Key Words: Macrophages; Toll-like receptor; Nod-like receptor; Flagellin; iNOS; Caspase-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf: “Apoptotic protease activating factor” (Fator de ativação de protease apoptótica)

FliC: “Flagellin” (Flagelina)

GPI: “Phosphatidylinositol” (Glicofosfatidil inositol)

ICE: “IL-1 beta Converting enzyme” (Enzima de conversão de IL-1 beta)

IDO: “Indolamina dioxigenase” (Indolamina dioxigenase)

IFN- γ : “Interferon gama” (Interferon gama)

IL: “Interleukin” (Interleucina)

Ipaf: “ICE- protease activating factor” (Fator de ativação de protease ICE)

i.p.: “Intraperitoneal” (Intraperitoneal)

LPS: “Lipopolysaccharid” (Lipopolissacarídeo)

LRR: “Leucin rich repeats” (Sequência rica em leucina)

MAL/TIRAP: “MyD88-adaptor like/TIR-associated protein” (Proteína associada ao TIR)

MHCII: “Major histocompatibility complex” (Complexo principal de histocompatibilidade)

MPO: “Mieloperoxidase” (Mieloperoxidase)

MyD88: “Myeloid differentiation factor 88” (Fator de diferenciação mielóide 88)

Naip: “Neuronal apoptosis inhibitor protein” (Proteína inibidora de apoptose neuronal)

NLR: “NOD like receptors” (Receptores do Tipo NOD)

NO: “Nitric Oxide” (Óxido nítrico)

NOD: “Nucleotide-binding oligomerization domain” (Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo)

PEC: “Peritoneal Cavity” (Cavidade Peritoneal)

TGF- β : “Transforming growth factor beta” (Fator beta de transformação do crescimento)

TIR: “Toll/IL-1R domain” (Domínio Toll/IL-1R)

TLR: “Toll like receptors” (Receptores do Tipo Toll)

TRAM: “TRIF- related adaptor molecule” (Molécula adaptadora relacionada ao TRIF)

TRIF: “Toll/IL-1R domain – Containing adaptor inducing IFN-beta”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise da produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais (MP) estimulados com flagelina.....	38
Figura 2: Análise da produção de IL-1 β por macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) estimulados com flagelina.....	39
Figura 3: Avaliação da produção de NO e expressão de iNOS por MP e MDMO	41
Figura 4: Avaliação da produção de NO e expressão de iNOS por MP e MDMO	42
Figura 5: Avaliação do efeito modulador de rIL-12 e rIL-18 na produção de NO, expressão de iNOS e produção de IL-1 β por macrófagos estimulados com flagelina.....	44
Figura 6: Avaliação da ativação do fator de transcrição NF- κ B por flagelina	45
Figura 7: Avaliação da produção de IL-6 por macrófagos peritoneais (MP)	46
Figura 8: Avaliação da produção de IL-1 β e expressão de iNOS por macrófagos peritoneais	48
Figura 9: Avaliação da produção de IL-1 β e expressão de iNOS por macrófagos peritoneais	49
Figura 10: Avaliação da expressão de iNOS por macrófagos derivados da medula óssea (MDMO).....	50
Figura 11: Avaliação da expressão de iNOS por macrófagos derivados da medula óssea (MDMO).....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Os macrófagos e receptores para padrões moleculares	18
1.2 Flagelina	22
1.3 TLR e NLR no controle de patógenos por macrófagos	24
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	31
3.2 Purificação da flagelina	31
3.3 Preparação da flagelina inserida no DOTAP	32
3.4 Obtenção de macrófagos peritoneais (MP)	32
3.5 Obtenção de M-CSF do sobrenadante da cultura de células L929	33
3.6 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO)	33
3.7 Tratamento das células peritoneais	33
3.8 Tratamento de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO)	34
3.9 Detecção de óxido nítrico e citocinas no sobrenadante das culturas	34
3.10 Detecção de iNOS e I κ B- α por Western Blotting	34
3.11 Análises Estatísticas	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Flagelina intracelular induz IL-1 β em macrófagos	37
4.2 Flagelina extra e intracelular induzem a expressão de iNOS por macrófagos	39
4.3 IL-12 e IL-18 modulam a produção de NO e expressão de iNOS mas não a produção de IL-1 β por macrófagos estimulados com flagelina	42
4.4 Flagelina intracelular se mostrou capaz de ativar NF- κ B	44
4.5 IL-6 não é produzida em resposta à flagelina intracelular	45
4.6 A expressão de iNOS por flagelina intracelular requer a atividade de caspase-1	47
4.7 Ipaf e Naip5 parecem estar envolvidos na indução da expressão de iNOS por flagelina	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	59
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os macrófagos e receptores para padrões moleculares

Os macrófagos (MØ) são células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear, originados a partir de um progenitor mielóide, compartilhado também por granulócitos. Após deixarem a medula óssea, são liberados no sangue periférico, onde circulam por vários dias como monócitos antes de alcançarem os tecidos e se diferenciarem em MØs [1, 2]. Os MØs são essenciais para o funcionamento do sistema imune [3] e dentre suas funções destacam-se a fagocitose e destruição de microorganismos, apresentação de antígenos para linfócitos T [4], remoção de células apoptóticas [5], resolução de processos inflamatórios [6], angiogênese [7] e reparo e remodelamento tissular [8].

Os MØs são considerados sentinelas imunológicas por sua distribuição nos diferentes tecidos do organismo, onde iniciam a resposta imune pelo reconhecimento de padrões moleculares freqüentemente associados a patógenos (*Pathogen associated molecular patterns* – PAMPS) [9]. Vários tipos de receptores para reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* – PRR) estão presentes nessas células, como os receptores do tipo lectina que ligam-se a carboidratos presentes na superfície de microorganismos (p.e. manose e β -glucanos) [10] e receptores tipo scavengers envolvidos no reconhecimento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas (envolvidas no processo de aterosclerose), de eritrócitos e células apoptóticas, além de uma variedade de patógenos [11].

Nesse contexto, a descoberta dos receptores do tipo Toll (TLR) revolucionou o conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos no reconhecimento pelo sistema imune inato e têm alcançado posição de destaque na literatura científica atual. Os TLR são moléculas transmembranas que contêm um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina, particular para cada TLR, e uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a citocina IL-1 (IL-1R), chamada TIR (domínio Toll/IL-1R) [12]. A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas como: MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*),

MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor like/TIR-associated protein*), TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*), TRAM (*Toll-receptor-associated molecule*) e SARM (*Sterile α - and armadillo-motif containing protein*) [13]. Essas proteínas adaptoras transduzem o sinal do TIR, ativando quinases e fatores de transcrição como NF- κ B e IRFs (*IFN-responsive factors*) [14]. Dá-se, dessa maneira, a ativação de diversos genes pró-inflamatórios, responsáveis pela produção de moléculas efetoras, citocinas pró-inflamatórias, interferons do tipo I, quimiocinas, expressão de moléculas co-estimuladoras, entre outros mediadores envolvidos no controle de patógenos e na indução da resposta imune adaptativa.

A família dos receptores do tipo Toll compreende, até o momento, treze proteínas identificadas em mamíferos (13 receptores identificados em camundongos e 11 receptores em humanos) [15]. Entre seus diversos ligantes, os melhores caracterizados são peptidoglicanas e lipoproteínas bacterianas, âncoras de GPI (glicofosfatidil inositol) presentes em protozoários e zimozan em fungos (ligantes de TLR2), RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3), lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante do TLR4), flagelina presente em bactérias móveis (ligante de TLR5) e seqüências de DNA ricas em CpG não metilados (ligante de TLR9), presentes em bactérias e vírus.

Recentemente, uma nova família de receptores para padrões moleculares tem sido descrita. Os receptores do tipo NOD-LRR (*Nucleotide-binding oligomerization domain – Leucin rich repeats*) ou NLR têm como característica peculiar sua localização citosólica e compreendem proteínas Nods (*nucleotide-binding oligomerization domain-1*), Nalps (*NATCH- LRR-and pyrin-domain-containing proteins*), Naips (*neuronal apoptosis inhibitor factors*), Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) e Ipaf (*ICE-protease activating factor*) [16, 17]. São proteínas formadas essencialmente por três domínios, sendo um domínio efetor N-terminal variável, um domínio central do tipo Nod e uma porção C-terminal com seqüências ricas em leucina (LRR). O reconhecimento de padrões se dá pela cauda LRR, o qual, quando recrutado, permite a oligomerização do domínio central do tipo NOD e ativação do domínio efetor. O domínio efetor pode ser do

tipo CARD (*caspase activation recruitment domain*), PYD (*pyrin domain*) ou BIR (*baculoviral IAP repeats domain*), dependendo do tipo de receptor recrutado, que, por sua vez, induz uma cascata de ativação que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B ou da protease caspase-1. Enquanto o fator de transcrição NF- κ B é capaz de induzir a transcrição de inúmeros genes, culminando na produção de diferentes moléculas efetoras, a caspase-1 é uma protease intracelular necessária para a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18. Além disso, a ativação da caspase-1 induz a morte de macrófagos infectados, por um processo denominado piroptose, fato que poderia indicar um mecanismo de resistência e controle da disseminação de patógenos [18, 19].

Os receptores do tipo NOD-LRR foram descobertos por sua homologia com a proteína de resistência (R), codificada por um gene de resistência presente em plantas. Este gene confere resistência a um determinado patógeno, uma vez que este contenha um gene de virulência correspondente ao gene de resistência presente na planta. Ainda, uma das subclasses do gene R, contém um domínio de ligação a nucleotídeos chamados NB-ARC, que é homólogo ao domínio Nod (NATCH). O domínio C-terminal LRR dos genes R das plantas é homólogo ao domínio LRR dos NLRs, porém, a proteína R tem o domínio N-terminal diferente, com grupos distintos de aminoácidos chamados TIR ou CC, ao invés de CARD, PYD ou BIR [20, 21]. Como o conhecimento dos NLR é bastante recente, pouco se sabe a respeito de seus ligantes e vias de sinalização. Porém dada a importância das proteínas R na defesa celular das plantas e a similaridade estrutural entre as proteínas R e os NLRs, podemos imaginar que os receptores NLRs são os receptores que detectam produtos microbianos no citosol, onde estão localizados. Ainda, algumas síndromes inflamatórias e susceptibilidade a infecções bacterianas têm sido associadas a mutações de alguns membros dos NLR [19, 22], indicando, mais uma vez, sua importância na regulação da resposta imune.

Dentre os membros da família dos NLR, os primeiros receptores identificados foram Nod1 e Nod2. Ambos os receptores reconhecem muropeptídeos derivados de peptídeoglicana, um dos principais componentes da

parece celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas [23, 24]. Enquanto Nod2 detecta muramyl dipeptideo (MDP), o reconhecimento de peptidoglicana bacteriana por Nod1 é dependente da presença de *meso*-DAP ou iE-DAP, um aminoácido característico de muitas bactérias, tais como *Listeria monocytogenes* e *Bacillus* ssp. Após ativação, Nod1 e Nod2, a partir de interações CARD-CARD, recrutam a serina-treonina kinase Rip2 ou RICK (*receptor-interacting caspase-like apoptosis-regulatory kinase*) e iniciam uma resposta pró-inflamatória dependente da ativação de NF- κ B [24, 25].

Outros membros da família NLR constituem complexos denominados inflamasomas, estrutura multi-proteica que compreende a proteína adaptadora intracelular ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e um receptor NLR que funciona como um “gatilho” para ativação da caspase-1 [26]. Dentre esses receptores, podemos citar os inflamasomas Nalp1, Nalp3 e o Ipaf. Sabe-se que o Nalp1 reconhece a toxina letal anthrax, enquanto o Nalp3 parece reconhecer múltiplos agonistas de origem microbiana e do hospedeiro, incluindo RNA bacteriano, RNA dupla fita presente em vírus, cristais de ácido úrico e efluxo celular de potássio [26, 27]. O fato dos receptores Nalp3 serem ativados em resposta ao ácido úrico e efluxo de potássio sugere que esses NLR detectam sinais de perigo, em adição a estímulos derivados de patógenos [28]. Por fim, o inflamassoma Ipaf foi identificado por responder à flagelina intracelular, proveniente de bactérias como *Salmonella typhimurium* e *Legionella pneumophila* [29, 30]. É importante ressaltar, que a ativação do inflamassoma por baixas concentrações de potássio é específica aos inflamasomas Nalp3. A ativação de Ipaf por *Shigella* ou *Salmonella* não é afetada por altas concentrações de potássio extracelular, indicando que os mecanismos da ativação de Nalp1 e Nalp3 e Ipaf, ocorrem de maneira distinta e independente [31]. Após detectar seus respectivos ligantes, Nalp1 e o Nalp3 recrutam a proteína adaptadora ASC através de interações homofílicas PYD-PYD. A proteína ASC contém um domínio N-terminal PYD e um domínio C-terminal CARD que permite o recrutamento da caspase-1, através de interações CARD-CARD. No caso do Ipaf, que contém um domínio N-terminal CARD, ao invés de PYD, as interações ocorrem com a proteína ASC ou

diretamente com o domínio CARD, presente na pró-caspase-1 [32, 33]. Assim, enquanto a ativação de Nod1 e Nod2 por seus ligantes induz a ativação de NF- κ B, as proteínas Nalps e Ipaf iniciam o processo inflamatório pela ativação da caspase-1.

O Naip5 (*Neuronal apoptosis inhibitory protein5*) é outro membro da família NLR envolvido no reconhecimento da flagelina citosólica, sendo esse receptor fundamental no controle da *L. pneumophila* por MØs, por um mecanismo dependente de caspase-1 [34-36]. Porém, ao contrário do Ipaf, a proteína Naip5 não apresenta o domínio efetor do tipo CARD, capaz de recrutar a caspase-1. Naip5 apresenta um domínio efetor do tipo BIR (*baculoviral IAP repeats domain*) e, para ativar a caspase-1, necessita interagir com outras moléculas que apresentam o domínio CARD, como ASC e Ipaf, [32, 33]. Essa variedade de interações, aliado ao fato da susceptibilidade à infecção por *Legionella pneumophila* apresentada pelos animais A/J (mutantes para Naip5) se apresentar patente mesmo na presença de Ipaf e caspase-1, sugerem que Naip5 possa utilizar mecanismos efetores distintos da caspase-1 para controlar infecções [37]. Vale ressaltar, porém, que alguns estudos já demonstraram que ambos os receptores Ipaf e Naip5 reconhecem a flagelina de maneira independente de TLR5 [30, 35, 38].

1.2 Flagelina

A flagelina faz parte de uma estrutura de superfície complexa, comum em bactérias móveis, chamadas de flagelo e que possuem mais de 15 μ m de comprimento. Tal estrutura atua como sensor captando informações químicas e físicas do ambiente e promove a migração desses microrganismos visando sua sobrevivência [39]. A flagelina tem sido alvo de muitos estudos devido sua importância na patogenicidade de bactérias flageladas. Esse fato foi demonstrado por estudos histológicos com linhagens bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* desprovidas de flagelo que revelaram infecções localizadas e mais atenuadas que as linhagens flageladas, as quais causam infecções generalizadas [40].

A estrutura flagelar é constituída por três porções, o corpo basal; um gancho que liga o corpo basal ao filamento; e o filamento flagelar propriamente dito [41]. O filamento flagelar é semelhante a um cilindro formado por 11 protofilamentos constituídos por polímeros [42]. Cada polímero é composto por monômeros, os quais são formados por domínios, chamados D0 a D4. O monômero de flagelina é constituído por duas regiões terminais conservadas, chamadas N e C terminais, que flanqueiam a região central. A região central é também conhecida como região hipervariável por não conservar seu tamanho nem composição. As regiões conservadas N e C terminais formam uma estrutura em α -hélice que constitui os domínios D0 e D1, enquanto as regiões variáveis D2 e D3 são expostas e estão relacionadas com a adesão bacteriana à superfície celular [41].

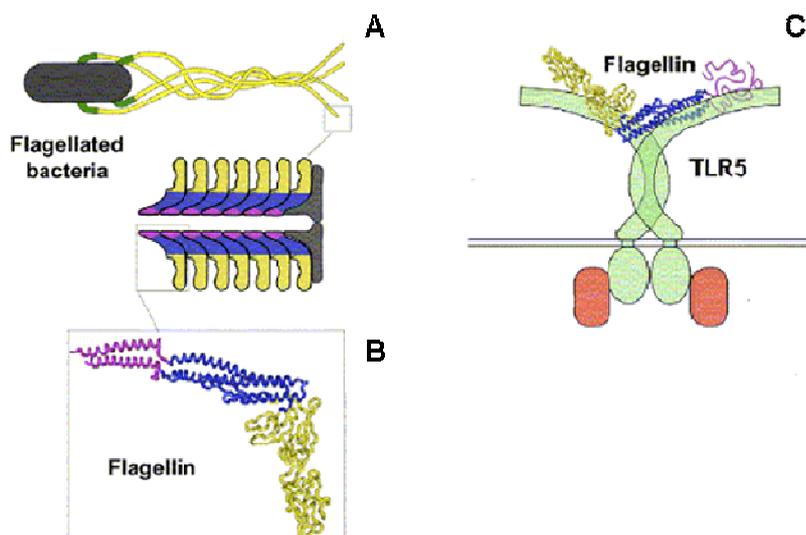


Figura 1: Estrutura da FliC. Bactérias flageladas apresentam o complexo flagelar, cada flagelo é composto por protofilamento os quais são formados por monômeros de flagelina (A). Cada monômero e flagelina é constituído por domínios D0 a D4 (B). Flagelina interage com seu receptor para padrão molecular (TLR5) (C).

Em 2001, Hayashi et al., utilizando frações purificadas de *Listeria monocytogenes*, caracterizaram a flagelina como ligante para o TLR5 em células mononucleares [43]. Além disso, demonstraram que a ativação de tal receptor promove a mobilização do fator nuclear NF- κ B para o núcleo celular estimulando a produção de TNF- α e IL-6 de maneira dependente de MyD88.

Mais recentemente, a flagelina foi descrita por sua habilidade em ativar os receptores citosólicos, Ipaf e Naip5 [19, 29, 30]. A flagelina é uma das poucas estruturas protéicas capazes de serem reconhecidas pelo sistema imune inato. Como dito anteriormente, o reconhecimento extracelular da flagelina se dá pelo TLR5 [43], porém a flagelina pode ser levada ao citosol através de sistemas de transporte, presentes em bactérias virulentas, como o sistema de secreção tipo III (TTSS) de *Salmonella* e do tipo IV (T4SS) de *Legionella*, onde ativaria os receptores NLR, Ipaf e Naip5 [19, 29, 30].

Os domínios da flagelina reconhecidos por TLR5 e Ipaf e/ou Naip5 são distintos. Enquanto TLR5 reconhece uma seqüência de aminoácidos específica presente no domínio D1 da flagelina [44], os receptores citosólicos parecem reconhecer uma região presente nos 35 aminoácidos localizados na porção C-terminal da flagelina, no domínio D0 [36]. A deleção desses aminoácidos faz com que a *Legionella pneumophila* perca motilidade, mostrando que os aminoácidos reconhecidos por Ipaf e Naip5 são fundamentais para a função do flagelo. Assim, os receptores do tipo Toll e do tipo Nod parecem compartilhar os mesmos ligantes, porém as circunstâncias nas quais os diferentes receptores interagem e a relevância deste fato para o controle das infecções ainda são desconhecidos.

1.3 TLR e NLR no controle de patógenos por macrófagos

O evento de reconhecimento inicial de patógenos é essencial para o controle dos mesmos e condução da resposta imune como um todo. O fato de TLR e NLR compartilharem os mesmos ligantes pode sugerir uma cooperação entre esses no sentido de otimizar a ativação celular frente a determinadas infecções, como vem sendo sugerido na literatura [45].

A ativação de MØs por TLR induz a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e IRFs, responsáveis pela transcrição de inúmeros genes pró-inflamatórios culminando na produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, mediadores provenientes do metabolismo lipídico (leucotrienos e prostaglandinas) e ativação

de enzimas como NO-sintase induzida (iNOS), NADPH-oxidase, mieloperoxidase (MPO), hemeoxigenase-1 (HO-1) e indoleamina dioxigenase (IDO).

Todos esses genes compõem o arsenal de mecanismos que os fagócitos dispõem para controlar os microorganismos reconhecidos. Dentre esses mecanismos, a geração de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) há muito tem sido considerada de fundamental importância para a degradação dos microorganismos ingeridos. Esses reativos modificam quimicamente e inativam proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos desses microorganismos [46, 47].

A produção de ROI é regulada pelo complexo protéico fagócito-oxidase (phox), enquanto o óxido nítrico (NO) é produzido pela conversão do aminoácido L- arginina e oxigênio molecular em citrulina, em uma reação catalizada pela enzima NOS. No caso dos fagócitos, pela isoforma iNOS [46]. A importância da iNOS e phox na defesa contra patógenos pode ser comprovada pela susceptibilidade a diversos microorganismos apresentada por animais deficientes nessas enzimas [48-50]. Ainda, os animais deficientes em ambas as enzimas sofrem de graves infecções e são incapazes de controlar até bactérias comensais, pontuando a geração de RNI e ROI como os principais mecanismos inatos para o controle de patógenos [51].

Porém, a susceptibilidade a infecções apresentada por animais deficientes em alguns membros da família NLR e/ou caspase-1, confere um papel bastante importante para essa protease, no controle de patógenos [52]. A ativação de caspase-1 como resultado do engajamento de inflamasomas tem sido relacionada com um processo de morte celular induzida por infecção, denominado piroptose. Apesar de a piroptose se apresentar como uma forma de morte celular programada e molecularmente regulada como a apoptose, os mecanismos moleculares envolvidos em seu controle e, especialmente, suas consequências para a resposta imune, são distintas daquelas observadas para a apoptose, a qual inibe ativamente a inflamação. Esta via pró-inflamatória de morte celular é exclusivamente dependente de caspase-1 e leva à destruição celular e

processamento das citocinas IL-1 β e IL-18 [53]. Assim, a piroptose vem sendo descrita como o mecanismo efetor envolvido na resistência dos macrófagos à infecção pelas bactérias *Legionella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, entre outras infecções, por induzir a morte de células infectadas, impedindo, assim, a disseminação do patógeno [52, 54-57]. Porém, ainda há muitas questões a serem sanadas nesse sentido, uma vez que outros mecanismos microbicidas também parecem atuar no controle desses patógenos, como é o caso do NO [58].

Os mediadores solúveis produzidos em resposta ao engajamento dos diferentes tipos de receptores para padrões moleculares também parecem ter papel primordial na modulação da resposta imune [45, 59]. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por M ϕ e células dendríticas (DCs) em resposta a ligantes de receptores do tipo Toll, cuja principal função é a indução da produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T, direcionando a polarização de linfócitos para o perfil Th1 de ativação [60]. Porém, além de conduzir o perfil de ativação dos linfócitos T, a IL-12 parece influenciar diretamente o perfil dos M ϕ e DCs por um mecanismo autócrino [61-63]. Dados obtidos por nosso grupo demonstraram que nos animais *knockouts* para IL-12, essas células sofrem uma polarização para o perfil 2 de ativação, com secreção espontânea de altos níveis de TGF- β e deficiência na produção de óxido nítrico (NO), [64, 65] frente a infecções pelos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium chabaudi* [51, 52].

A IL-18, outra citocina pró-inflamatória produzida por M ϕ s e DCs [66], age de maneira sinérgica com a IL-12, otimizando as suas ações [67-71]. Recentemente, nosso grupo mostrou que o pré-tratamento de macrófagos com IL-12 e IL-18 é capaz de programar essas células para secretarem altos níveis de NO e TNF- α em resposta ao LPS e a tripomastigotas de *T. cruzi*. A análise de animais *knockouts* para diversas moléculas mostrou que o efeito da rIL-12 e rIL-18 para a produção de NO depende de IFN- γ e IRF-1 e é parcialmente dependente da molécula adaptadora MyD88, enquanto que para a produção de TNF- α , essa molécula é essencial e o IFN- γ dispensável [72]. Ainda, o tratamento com rIL-12 e rIL-18 parece induzir o aumento da expressão e atividade das enzimas iNOS, NADPH e IDO

tornando os MØs mais resistentes a infecções por *Trypanosoma cruzi*, *Candida albicans* e *Klebsiela pneumoniae* (nossos dados ainda não publicados).

Uma vez que a IL-12 é produzida especialmente após ativação de receptores do tipo Toll [60, 73] e a IL-18 é secretada somente na presença de caspase-1, ativada especialmente por receptores do tipo Nod [74], a interação entre esses receptores e as citocinas induzidas por esses, poderiam trabalhar de maneira coordenada no sentido de amplificar a resposta dos MØs e DCs a infecções. Nesse mesmo contexto de interação entre receptores para padrões moleculares e citocinas, Totemeyer e seus colaboradores propuseram que o IFN- γ interage com Nod2 para a secreção de NO por macrófagos [75] e Dietrich e seus colaboradores mostraram que TNF- α e IFN- $\alpha\beta$ cooperam com Naip5 e Ipaf no controle da *Legionella* [76]. Diante do exposto, fica claro que vários são os mecanismos que podem estar envolvidos no controle de infecções por MØs. Porém, resta ainda entender o que faz com que um mecanismo efetor predomine e, principalmente, em qual situação a morte é o melhor destino para os MØs infectados. Assim, um dos grandes desafios da imunidade inata é entender a contribuição relativa dos diferentes tipos de PRR na ativação de MØs e resistência contra patógenos. No caso particular da flagelina esse estudo parece ser ainda mais interessante uma vez que o TLR5 parece reconhecer todas as bactérias flageladas enquanto Ipaf e Naip5 parecem reconhecer apenas bactérias invasivas. Assim, o entendimento do papel diferencial dessas vias de reconhecimento e suas possíveis interações, trarão importantes informações a respeito da lógica do reconhecimento imune.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do reconhecimento da flagelina intra e extracelular na ativação de MØs, assim como a participação de caspase-1, Naip5 e Ipaf nesses efeitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6 com 6-8 semanas de idade, mantidos em condições SPF (specific pathogen free), foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia, ICB-USP. Camundongos A/J, Naip5^{B6/AJ}, Naip5^{AJ/AJ}, Caspase-1^{-/-} e Ipafl^{-/-} foram gentilmente cedidos pelo Dr^o Dario Zamboni, professor titular do departamento de Biologia Celular da USP-RP.

3.2 Purificação da flagelina

A linhagem de *Salmonella typhimurium* LDV322 utilizada para a extração do flagelo foi semeada em 50 mL de meio LB e incubada a 37 °C com agitação de 80 rpm durante 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 rpm por 15 minutos, e ressuspensas em 2 mL de PBS. A suspensão bacteriana foi agitada em agitador tipo “vortex” em 4 ciclos de 2 minutos, com intervalos de 1 minuto no gelo. Após a remoção das células (centrifugação a 8.000 rpm, 15 minutos a 4 °C) o sobrenadante foi coletado em frasco tipo “corex” e adicionado 3 a 4 volumes de acetona gelada para precipitação da flagelina presente. Após 30 minutos de repouso a -20 °C, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e o precipitado ressuspensado em aproximadamente 0,5 mL de PBS. A quantidade total de proteínas foi determinada usando-se o método de BSA Pierce e a pureza foi determinada em gel de poliacrilamida a 15% com coloração por Coomassie Blue R-250. Para a completa remoção de LPS presente na preparação de flagelina utilizou-se a coluna Gel-detoxi (*Pierce*) e a confirmação da remoção foi feita utilizando o Kit LAL da Cambrex. A preparação de flagelina foi gentilmente cedida pelo grupo do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira. (Massis L.M – tese)

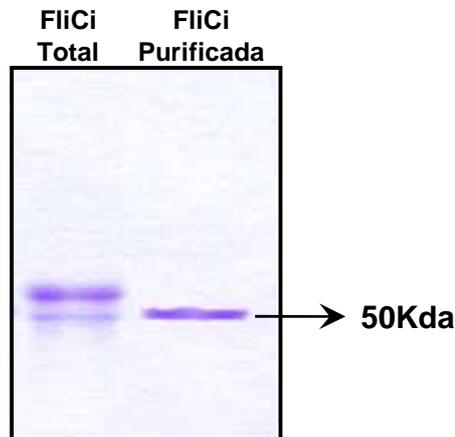


Figura 2: FliCi e FjiB. A flagelina é extraída da bactéria *Salmonella enterica serovar typhimurium* SL3261 como citado acima e a seguir passa por uma coluna de cromatografia para purificação. A figura mostra o gel de proteína antes e após a purificação.

3.3 Preparação da flagelina inserida no DOTAP

Flagelina purificada da bactéria gram negativa *Salmonella entérica serovar typhimurium* e gram positiva *Bacillus subtilis* foi inserida em vesículas lipídicas catiônicas DOTAP (*dioleoyl trimethylammonium propane*) (Roche) (FliCDot), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 1 µg de flagelina purificada foi adicionado à 5 µL de DOTAP, homogeneizados e mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente para a formação de complexos espontâneos. Após a formação dos complexos o mix de flagelina/DOTAP (FliCDot) foi adicionado à cultura celular. Desta maneira, a flagelina pode ser levada para o citosol celular, como têm sido descrito na literatura [77, 78].

3.4 Obtenção de macrófagos peritoneais (MP)

Camundongos C57Bl/6 foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p) com amido de batata (STARCH, 1%) (SIGMA) e após 4 dias, o lavado peritoneal (PEC) dos animais foi removido por lavagem com PBS (5 mL).

3.5 Obtenção de M-CSF do sobrenadante da cultura de células L929

As células L929 foram gentilmente cedidas pelo Dr Dario Zamboni, da USP-RP. Resumidamente, as células L929 foram colocadas em cultura em garrafa de 5 mL com meio RPMI 10% SFB, 1% de glutamina e 1% de penicilina e streptomina (pen-strepto) (*Gibco*) por 1-2 dias até entrarem em confluência. Após 2 dias em cultura as células foram expandidas para uma garrafa de 80 mL e após entrarem em confluência novamente (2-3 dias) as células foram mantidas por 7 dias para produção de M-CSF. Após este período, o sobrenadante da cultura foi coletado, centrifugado e filtrado.

3.6 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO)

Os fêmures dos camundongos foram removidos e a medula óssea foi retirada com lavagens do osso com uma seringa contendo 5 mL de meio de cultura. As células de medula óssea foram contadas e para a diferenciação em MØs e plaqueadas em placa petri sem tratamento por 7 dias com meio RPMI contendo 10% SFB, 1% glutamina, 1% pen-strep e 30% do sobrenadante de células L929 contendo M-CSF.

3.7 Tratamento das células peritoneais

As células peritoneais (6×10^5) obtidas dos camundongos previamente inoculados com AMIDO (*STARCH*) (1%) (*Sigma*) foram colocadas em cultura em meio RPMI 3% suplementado (*Sigma*) por 4 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, em placas de 96 poços (*Costar*), para aderência. As células não aderentes foram retiradas após vigorosas lavagens com meio RPMI morno e as células peritoneais aderentes foram estimuladas com flagelina purificada da bactéria *Salmonella entérica serovar typhimurium* ou da bactéria *Bacillus subtilis* (3 µg/mL) em sua forma livre (FliC) ou inserida em vesículas lipídicas catiônicas

DOTAP (*Roche*) (FliCDot). Os estímulos foram realizados na presença ou não de rIL-12 e rIL-18 (*Pharmingen*) (2,5 ng/ml cada). Como controle, os MØs foram colocados com meio de cultura ou com a vesícula DOTAP vazia (Dot).

3.8 Tratamento de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO)

Após a diferenciação em MØs, as células foram retiradas da placa petri através de lavagens com PBS gelado, centrifugadas, contadas e plaqueadas em placa de 96 poços. Os estímulos foram realizados da mesma forma como para macrófagos peritoneais, como descrito acima.

3.9 Detecção de óxido nítrico e citocinas no sobrenadante das culturas

A produção de óxido nítrico (NO) foi analisada pelo método de *Griess*, como descrito previamente [79]. Resumidamente, 50 µl do sobrenadante de cultura foram incubados com 50 µl do reagente de *Griess* (preparados com reagentes da Sigma) por 5 minutos em temperatura ambiente. A concentração de NO₂ foi determinada por leitura da densidade óptica a 540 nm em referência ao padrão da solução de NaNO₂. As dosagens foram realizadas em duplicata.

A produção de IL-1β e IL-6 foi analisada por ELISA *sandwich* de captura, utilizando kits da Pharmingen, de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas em duplicata.

3.10 Detecção de iNOS e IκB-α por *Western Blotting*

Os MØs foram lisados com tampão SDS (*sodium dodecyl sulfate*) (50 mM Tris-HCl, Ph 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 2,5% de β-mercaptoetanol). A amostra foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e estocada a -80 °C. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (8% ou 12%) contendo SDS e submetidas à eletroforese. As proteínas do gel foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos policlonais para iNOS e IκB-α. A

detecção dos imunocomplexos foi realizada pelo método de quimioluminescência utilizando o kit ECL (*Amershan*), de acordo com as instruções do fabricante.

3.11 Análises Estatísticas

Análise estatística foi realizada através do Teste *Turkey*. As diferenças entre os grupos serão consideradas significantes quando o valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) e $p < 0,001$ (**).

4 RESULTADOS

4.1 Flagelina intracelular induz IL-1 β em macrófagos

O reconhecimento da flagelina parece ser compartilhado pelos receptores TLR5 e Ipaf e Naip5, membros da família NLR. No intuito de tentar elucidar as conseqüências do reconhecimento extracelular e intracelular da flagelina para a ativação de MØs, MØs peritoneais (MP) ou derivados da medula óssea (MDMO) de camundongos C57BL/6 foram estimulados com flagelina proveniente de *Salmonella typhimurium*, em sua forma livre (FliC) (3 μ g/mL), capaz de ativar o receptor TLR5 [43], ou inserida em vesículas lipídicas catiônicas (DOTAP) (FliCDot) (3 μ g/mL), a qual facilita a entrega do agonista no citosol da célula, onde ativariam os receptores NLR, Naip5 e Ipaf [29, 34]. Ainda, para eliminar artefatos de resíduos mínimos de LPS que poderiam permanecer após a purificação e tratamento da flagelina de *S. typhimurium*, os MØs também foram estimulados com flagelina proveniente de uma bactéria gram positiva, *Bacillus subtilis*. Como controle, os MØs foram mantidos apenas com meio de cultura ((-)) ou com as vesículas lipídicas DOTAP vazias (Dot). Todas as doses aqui utilizadas foram previamente estabelecidas por nosso grupo.

O primeiro parâmetro avaliado foi a produção de IL-1 β , como indicativo da ativação da caspase-1. Sabe-se que a ativação de TLR5 por flagelina induz a transcrição e translocação da pró-IL-1 β , mas não sua secreção. Para que haja a secreção de IL-1 β é necessário um segundo sinal que induz a ativação da caspase-1, que por sua vez cliva a pró-IL-1 β para sua forma madura [57].

Após 24 horas de cultura com as flagelinas, o sobrenadante dos MØs foi retirado para análise da produção de IL-1 β por ELISA. Como mostra a Figura 1A, apenas o estímulo com FliCDot de *B.subtilis* foi capaz de induzir a produção de IL-1 β por MP, sugerindo a ativação da caspase-1 necessária para a liberação desta citocina, fato que não ocorre após o estímulo com FliC (Figura 1A).

Assim como para *B.subtilis*, o estímulo com FliCDot de *S. typhimurium* induziu altos níveis da produção de IL-1 β por MØs (Figura 1B). No entanto, de maneira inesperada, o estímulo com FliC também foi capaz de induzir a produção de níveis significativos de IL-1 β por MP (Figura 1B), sugerindo que, de alguma

maneira, a flagelina proveniente de *S. typhimurium*, em sua forma livre, parece também induzir a ativação de caspase-1.

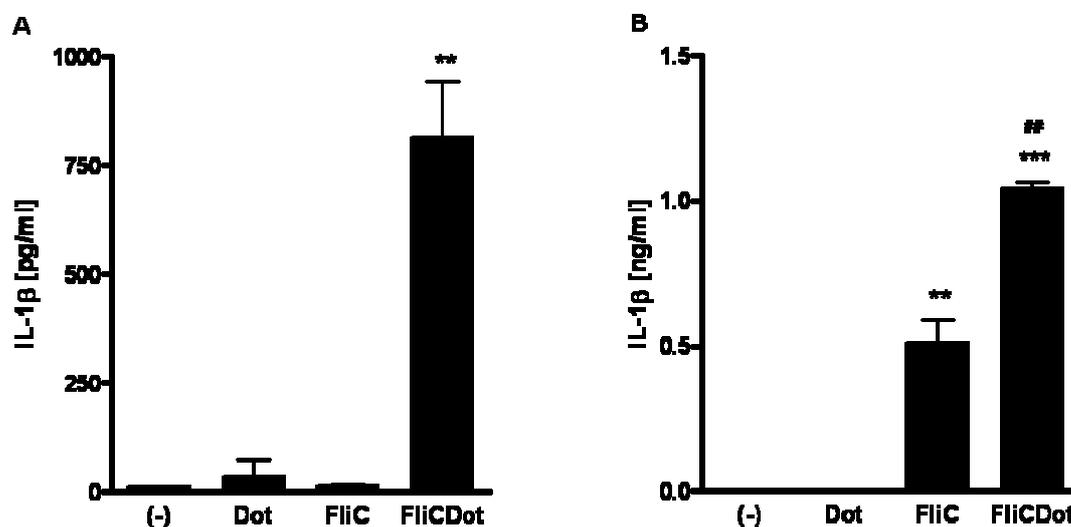


Figura 1: Análise da produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais (MP) estimulados com flagelina. MP provenientes de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% foram plaqueados em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimulados com meio RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram positiva *B. subtilis* (A) ou da bactéria gram negativa *S. typhimurium* (B), em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$). Após 24 horas, o sobrenadante da cultura foi retirado para análise da produção de IL-1 β por ELISA. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes, com o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados são provenientes de um experimento representativo com $n=3$. ** $p < 0.01$ em relação ao grupo controle. *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle. ## $p < 0.01$ em relação ao grupo FliC.

Grande parte da literatura envolvendo o estudo de NLR utiliza como modelo experimental MDMO no intuito de eliminar a interferência de outros tipos de populações celulares. Ainda que a população de MP utilizada em nossos estudos seja representada por 98% de células F4/80⁺ (dados não mostrados), decidimos verificar o efeito da flagelina de ambas as bactérias na ativação da caspase-1 nessas células, seguindo o mesmo parâmetro de produção de IL-1 β .

A produção de IL-1 β por MDMO em resposta à FliCDot de *S. typhimurium* foi cerca de dez vezes menor do que aquela apresentada pelos MP (Figura 2). Ainda, não houve produção de níveis detectáveis de IL-1 β por FliCDot de *B. subtilis*. Esses dados parecem estar de acordo com a literatura, uma vez que a

maioria dos trabalhos utiliza estimulação prévia com LPS no intuito de estimular a produção de pró-IL-1 β [80]. Vale ressaltar que assim como em MP, o estímulo com FliC de *S. typhimurium* também foi capaz de induzir a produção de IL-1 β , ainda que em baixas concentrações. Este dado sugere novamente um mecanismo desconhecido para a flagelina de *S. typhimurium* na ativação da caspase-1 (Figura 2B), dados que necessitam maiores elucidacões.

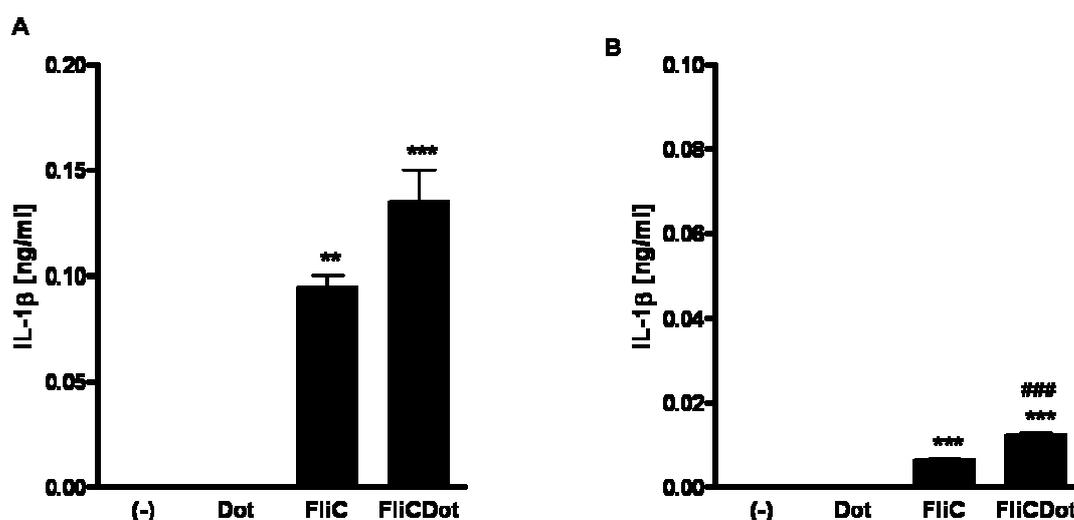


Figura 2: Análise da produção de IL-1 β por macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) estimulados com flagelina. MDMO provenientes de camundongos C57BL/6 foram plaqueados em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimulados com meio RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram positiva *B. subtilis* (A) ou da bactéria gram negativa *S. typhimurium* (B), em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/mL}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/mL}$). Após 24 horas, o sobrenadante da cultura foi retirado para análise da produção de IL-1 β por ELISA. Os experimentos foram repetidos duas vezes, com o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados são provenientes de um experimento representativo com $n=3$. ** $p < 0.01$ em relação ao grupo controle. *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle. ### $p < 0.001$ em relação ao grupo FliC.

4.2 Flagelina extra e intracelular induzem a expressão de iNOS por macrófagos

Os M ϕ s dispõem de grande diversidade de mecanismos efetores envolvidos no controle de patógenos. Dentre eles, a ativação da enzima iNOS, com conseqüente geração de reativos intermediários do nitrogênio têm sido

relacionada à via de ativação por TLR e o processo de piroptose, induzido pela ativação da caspase-1, mediado por NLR [81].

Assim, o próximo passo foi verificar a produção de NO e a expressão de iNOS pelo método de *Griees* e *Western Blotting*, respectivamente. Para isso, MP e MDMO foram estimulados como descrito para a produção de IL-1 β . A figura 3A mostra que, ainda que em baixas concentrações, tanto o estímulo com FliC quanto com FliCDot de *S. typhimurium* induziram níveis de NO acima do limite de detecção do ensaio (Figura 3A). Porém, apenas o resultado com FliC foi considerado significativo.

O efeito dos agonistas é ainda mais claro na indução da expressão da iNOS, onde, surpreendentemente, ambos os estímulos foram capazes de induzir uma alta e semelhante expressão dessa enzima em MP (Figura 3A). O mesmo resultado foi obtido com MDMO, onde observamos claramente a expressão de iNOS após ambos os estímulos, FliC e FliCDot, ainda que em níveis inferiores comparados aos MP (Figura 3B). Vale ressaltar que, em ambos os casos, observamos uma completa ausência de ativação de iNOS nos MØs estimulados com vesículas DOTAP vazias (Dot) ou mantidos apenas com meio de cultura.

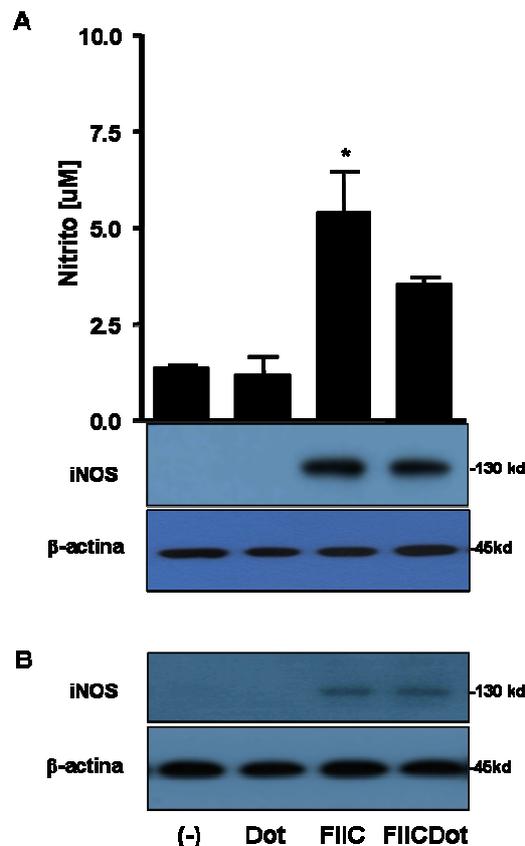


Figura 3: Avaliação da produção de NO e expressão de iNOS por macrófagos peritoneais (MP) e macrófagos derivados de medula óssea (MDMO). MP (A) proveniente de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% e MDMO (B) foram plaqueadas em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas meio RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram negativa *S. typhimurium*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/ml}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/ml}$). Após 24h, o sobrenadante da cultura foi retirado para a análise da produção de NO pelo método de Griess. A expressão de iNOS e β -actina foi avaliada nos lisados celulares por Western Blotting. Os dados representam a média \pm DP de um experimento demonstrativo de 5, realizados com $n = 3$. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle.

Em seguida fomos avaliar se este mesmo efeito se repetia com MØs estimulados com flagelina da bactéria gram positiva *B. subtilis*. Mais uma vez, a expressão de iNOS foi induzida por ambas as formas da flagelina tanto em MP (Figura 4A) como em MDMO (Figura 4B). No entanto, ao contrário da *S. typhimurium*, o estímulo com FliC de *B. subtilis* se apresentou mais potente que FliCDot. O fato de a flagelina intracelular induzir a ativação de iNOS, sugere a

participação de receptores citosólicos e/ou das moléculas adaptadoras ali presentes, na indução desta enzima, um efeito ainda desconhecido.

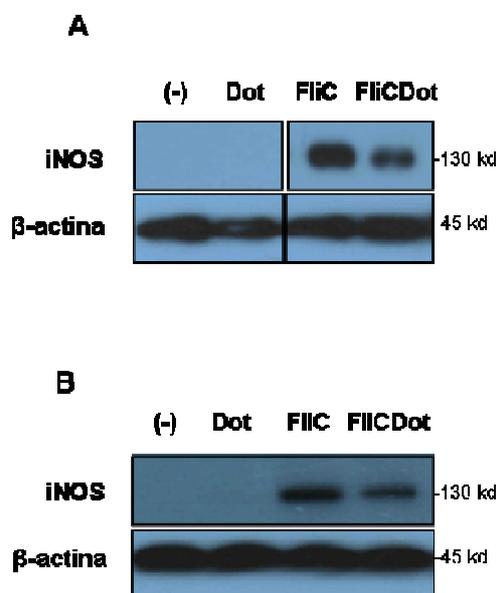


Figura 4: Avaliação da expressão de iNOS por macrófagos peritoneais (MP) e macrófagos derivados de medula óssea (MDMO). MP (A) provenientes de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% e MDMO (B) foram plaqueados em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram positiva *B.subtilis*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/ml}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/ml}$). Após 24 horas, as células foram lisadas com SDS e a expressão de iNOS e β -actina foram avaliadas por *Western Blotting*, como descrito em *materiais e métodos*. Os dados representam experimentos demonstrativos de um total de 3, com $n = 3$ cada.

4.3 IL-12 e IL-18 modulam a produção de NO e expressão de iNOS mas não a produção de IL-1 β por macrófagos estimulados com flagelina

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por M ϕ s e células dendríticas (DCs) em resposta a ligantes de receptores do tipo Toll. A IL-18, outra citocina pró-inflamatória produzida por M ϕ s e DCs [66], age de maneira sinérgica com a IL-12, otimizando as suas ações [67-71], sendo que sua secreção depende da ação da caspase-1, ativada por NLR. Ainda, nosso grupo de pesquisa mostrou que o pré-tratamento com rIL-12 e rIL-18 é capaz de programar os M ϕ s

para produzirem altos níveis de NO em resposta a agonistas de TLR, como o LPS [72].

Diante desse contexto, para verificar a influência de fatores solúveis produzidos em resposta a TLR e NLR, os MØs foram estimulados como descrito acima, na presença ou não de rIL-12 e rIL-18. Após 24 horas, o sobrenadante foi retirado para análise da produção de IL-1 β e NO e as células foram lisadas para avaliação da expressão de iNOS por *Western Blotting*. O tratamento com rIL-12 e rIL-18 na ausência de agonistas induziu a produção de níveis muito baixos de NO (Figura 5A), assim como observado para os agonistas na Figura 3A. Porém, a presença das citocinas aumentou cerca de quatro vezes a produção de NO em resposta à FliC e FliCDot, induzindo a produção de altos níveis de NO (Figura 5A).

O mesmo perfil observado na produção de NO em resposta à FliC e FliCDot, na presença ou não de rIL-12 e rIL-18, foi observado na expressão de iNOS (Figura 5B). Nota-se um nítido aumento na expressão desta enzima na presença das citocinas, tanto em MP (dados não mostrados) quanto em MDMO (Figura 5B).

De maneira interessante, apesar do claro efeito modulador de rIL-12 e rIL-18 na produção de NO e expressão de iNOS, o mesmo não foi observado para a produção de IL-1 β (Figura 5C), mostrando que os mediadores inflamatórios produzidos em resposta à ativação de TLR e NLR não são capazes de influenciar todos os parâmetros de ativação dos MØs.

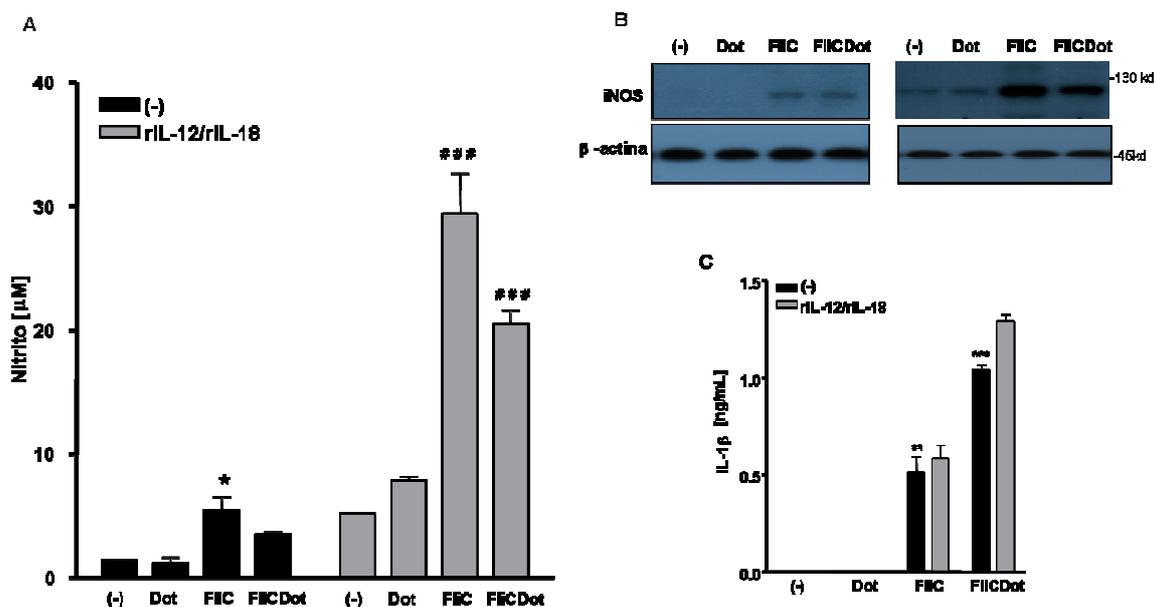


Figura 5: Avaliação do efeito modulador de rIL-12 e rIL-18 na produção de NO, expressão de iNOS e produção de IL-1 β por macrófagos estimulados com flagelina. MP (A e C) provenientes de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% e MDMO (B) foram plaqueadas em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram negativa *S. typhimurium*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/ml}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliC/Dot) ($3 \mu\text{g/ml}$). Após 24 horas o sobrenadante da cultura foi retirado para análise da produção de NO pelo método de Griess e IL-1 β por ELISA. Em seguida as células foram lisadas com SDS e a expressão de iNOS foi avaliada por *Western Blotting*, como descrito em *materiais e métodos*. Os dados representam dois experimentos demonstrativos de 3. Figura A * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle; ### $p < 0.001$ em relação ao grupo não tratado com rIL-12 e rIL-18. Figura C ** $p < 0.01$ em relação ao grupo controle, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle.

4.4 Flagelina intracelular se mostrou capaz de ativar NF- κ B

Sabe-se que o promotor gênico da iNOS contém sítios de ligação para os fatores de transcrição NF- κ B e IRF-1 [82, 83], o que explicaria a expressão dessa enzima induzida por FliC, pelo eixo TLR5-MYD88-NF- κ B e o claro efeito sinérgico de FliC com IL-12 e IL-18, uma vez que as citocinas são capazes de ativar IRF-1 [72]. Porém, os dados obtidos com a flagelina intracelular tornam-se interessantes uma vez que a mesma é reconhecida por IpaF e/ou Naip5, que culminam na ativação da caspase-1 e não de NF- κ B e IRF-1.

Assim, para avaliar se o estímulo com FliCDot, ou seja, com a flagelina intracelular, é capaz de ativar NF- κ B, as células peritoneais aderentes foram colocadas em cultura e estimuladas com FliC ou FliCDot por 10, 30, 60, 90 e 120 minutos para análise da ativação do fator de transcrição NF- κ B, através da fosforilação de I κ B- α por *Western Blotting*. Somente após fosforilação, I κ B- α é translocado para o núcleo, onde ocorre ativação de NF- κ B [84].

De forma esperada, mostramos que a fosforilação de I κ B- α ocorre entre 10 e 30 minutos após o estímulo com FliC. Porém, observamos o mesmo efeito após estímulo com FliCDot (Figura 6). Ainda que por um mecanismo desconhecido, este dado sugere que a ativação de NF- κ B por FliCDot possa estar envolvida com a indução de iNOS, na presença ou não de rIL-12 e rIL-18.

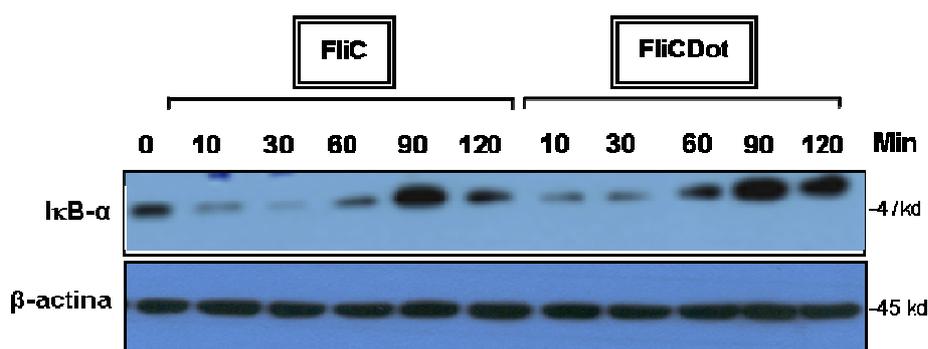


Figura 6: Avaliação da ativação do fator de transcrição NF- κ B por flagelina. MP provenientes de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% foram plaqueados em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com flagelina purificada proveniente da bactéria gram negativa *S. typhimurium*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/ml}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/ml}$) por 10, 30, 60, 90 e 120 minutos. As células foram lisadas com SDS e a ativação de NF- κ B foi analisada através da fosforilação de I κ B- α por *Western Blotting*, como descrito em *material e métodos*.

4.5 IL-6 não é produzida em resposta à flagelina intracelular

Vimos que a flagelina intracelular induz a ativação de NF- κ B (Figura 6), fato que poderia ter reflexo na expressão de iNOS. Como a produção de IL-6 também depende da ativação deste fator de transcrição [38], questionamos se o estímulo

com FliCDot também induziria a produção desta citocina. Para responder essa questão, MP provenientes de camundongos C57BL/6 foram estimulados com FliC e FliCDot, como descrito para análise da produção de IL-1 β . Após 24 horas de estímulo, o sobrenadante da cultura foi retirado para a análise da produção de IL-6 por ELISA.

O estímulo com FliC induziu a produção de altos níveis de IL-6 por MP, ao contrário do estímulo com FliCDot (Figura 7). Apesar da capacidade de FliCDot em ativar NF- κ B, nem todos os genes dependentes desse fator de transcrição são induzidos pela mesma, sugerindo seu envolvimento peculiar na ativação da iNOS.

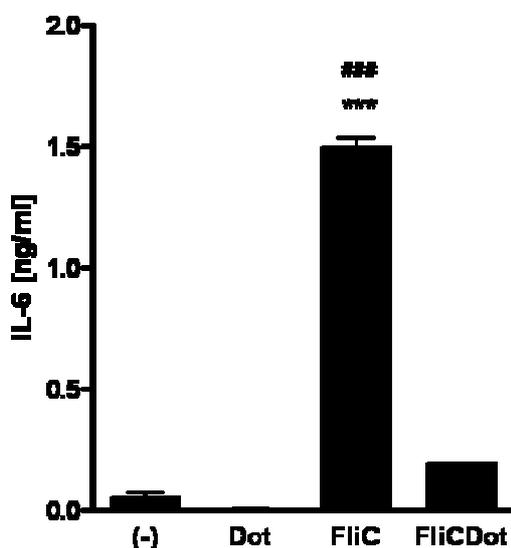


Figura 7: Avaliação da produção de IL-6 por macrófagos peritoneais (MP). MP provenientes de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% foram plaqueados em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimulados com meio RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram negativa *S. typhimurium*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/mL}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/mL}$). Após 24 horas, o sobrenadante da cultura foi retirado para análise da produção de IL-6 por ELISA. Os dados representam dois experimentos demonstrativos de três. *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle. ### $p < 0.001$ em relação ao grupo FliCDot.

4.6 A expressão de iNOS por flagelina intracelular requer a atividade de caspase-1

Como dito previamente, os receptores citosólicos Ipaf e Naip5, envolvidos no reconhecimento da flagelina intracelular, fazem parte de um complexo denominado inflamasoma, cuja ativação culmina na maturação da serino-protease caspase-1. Sendo assim, todas as funções efetoras induzidas pelo engajamento de Ipaf e Naip5 se mostram dependentes de caspase-1 [36, 54]. Para verificarmos o envolvimento da caspase-1 nos efeitos obtidos pelo estímulo com FliCDot, os MØs foram estimulados como já descrito, na presença ou não do inibidor de caspase-1 (Z-YVAD – FMK, *fluoromethyl ketone*) (1 mM) para análise da produção de IL-1 β e expressão de iNOS.

Como esperado, na presença de Z-YVAD, não houve secreção de IL-1 β pelos MP estimulados com FliCDot de *B. subtilis* (Figura 8A). Ainda, pudemos verificar o claro envolvimento da caspase-1 na indução da expressão de iNOS por esse estímulo, a qual é praticamente abolida na presença de Z-YVAD (Figura 8B). Vale ressaltar que a expressão de iNOS induzida por FliC de *B. subtilis* não foi alterada por Z-YVAD, mostrando que as formas livre e citosólica da flagelina de *B. subtilis* induzem a expressão de iNOS por mecanismos distintos, sendo esse último dependente de caspase-1, ainda desconhecido.

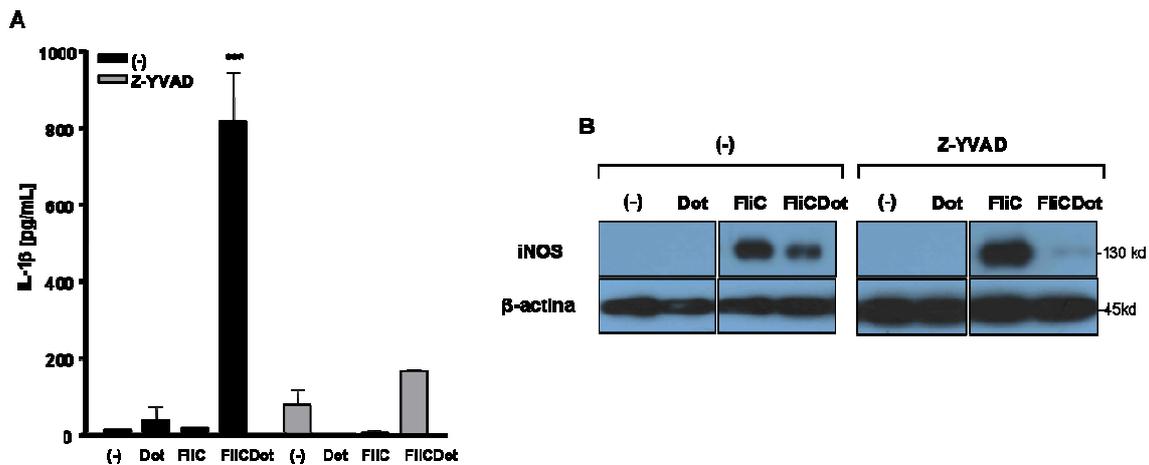


Figura 8: Avaliação da produção de IL-1 β e expressão de iNOS por macrófagos peritoneais (MP). MP provenientes de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% foram plaqueadas em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria *B.subtilis*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/ml}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/ml}$) na presença de Z-YVAD (1mM). Após 24 horas o sobrenadante da cultura foi removido para análise da produção de IL-1 β (A) por ELISA. Em seguida as células foram lisadas com SDS e a expressão de iNOS (B) foi avaliada por *Western Blotting*, como descrito em *materiais e métodos*. Os dados representam um experimentos demonstrativo de 2 experimentos.

Uma vez que a secreção de IL-1 β é sabidamente dependente de caspase-1, os níveis altos de IL-1 β obtidos com FliC de *S. typhimurium* (Fig 1B) sugerem que, de alguma maneira, a flagelina livre dessa bactéria poderia estar ativando caspase-1. De fato, a adição de Z-YVAD às culturas inibiu, ainda que não completamente, a secreção de IL-1 β frente a ambos os estímulos, FliC e FliCDot de *S. typhimurium* (Figura 9A). Interessante, ao contrário do observado para *B. subtilis*, a inibição de caspase-1 também diminuiu a expressão da iNOS em resposta às duas formas da flagelina (Figura 9B). Em conjunto, os dados mostram a participação da caspase-1 para a secreção de IL-1 β e ativação da iNOS em resposta à flagelina intracelular, provavelmente como resultado do seu reconhecimento por IpaF e/ou Naip5. Nesse sentido, resta ainda entender o mecanismo utilizado pela flagelina livre de *S. typhimurium* para ativar a caspase-1.

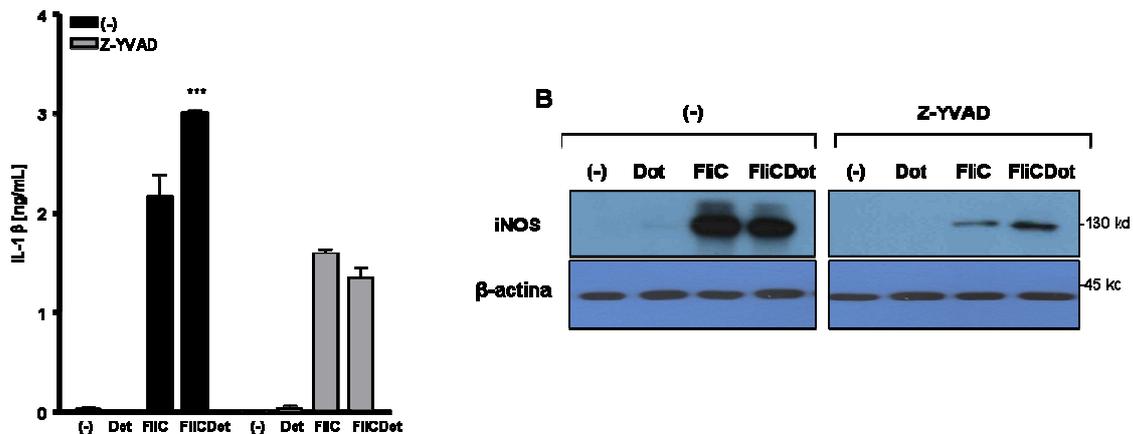


Figura 9: Avaliação da produção de IL-1 β e expressão de iNOS por macrófagos peritoneais (MP). MP provenientes de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com STARCH 1% foram plaqueadas em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram negativa *S. typhimurium*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/ml}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/ml}$) na presença ou de Z-YVAD (1mM). Após 24 horas o sobrenadante da cultura foi removido para análise da produção de IL-1 β (A) por ELISA. Em seguida as células foram lisadas com SDS e a expressão de iNOS (B) foi avaliada por *Western Blotting*, como descrito em *materiais e métodos*. Os dados representam um experimento demonstrativo de dois experimentos.

4.7 Ipaf e Naip5 parecem estar envolvidos na indução da expressão de iNOS por flagelina

Para verificar o envolvimento dos receptores citosólicos Ipaf e Naip5 no reconhecimento da flagelina e conseqüente ativação da caspase-1 e iNOS, MDMO provenientes de camundongos C57BL/6, Ipaf KO, Caspase-1 KO e A/J (mutante para o gene Naip5) foram estimulados como descrito acima para a análise da produção de IL-1 β e expressão de iNOS. Ainda, uma vez que o *background* genético dos animais pode influenciar a ativação da iNOS [85], utilizamos também camundongos Naip5^{B6/AJ} (geração F4 C57BL/6 X A/J, com alelo Naip5 de C57BL/6) e Naip5^{AJ/AJ} (geração F4 C57BL/6 X A/J, com alelo Naip5 de A/J) para verificar o envolvimento de Naip5, uma vez que os animais *knockouts* apresentam o *background* genético dos animais C57BL/6.

A figura 10 mostra que a expressão da iNOS por MDMO estimulados com FliCDot de *B. subtilis* parece ser parcialmente dependente de Ipaf, uma vez que notamos uma pequena diminuição na expressão de iNOS por MDMO de Ipaf KO quando comparado com MDMO de C57BL/6. No entanto, a participação de Naip5 parece ser muito mais evidente, uma vez que a expressão de iNOS apresentada por MDMO de Naip5^{B6/AJ} é completamente abolida nos MDMO dos animais A/J (Figura 10). Importante ressaltar que, mais uma vez, não foi observada expressão de iNOS com meio de cultura e vesículas DOTAP vazias, em todas as linhagens estudadas (dados não mostrados).

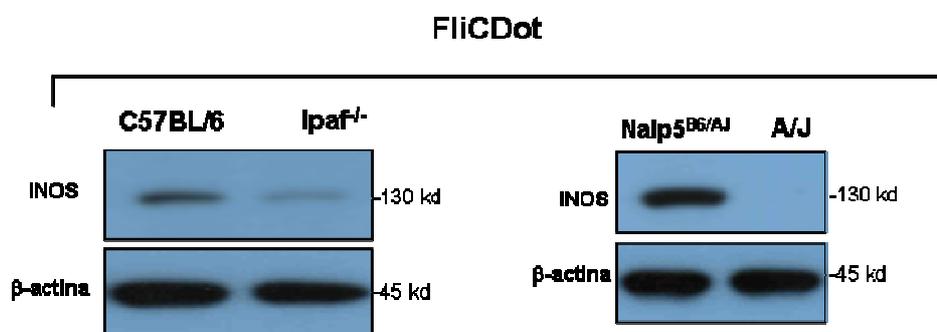


Figura 10: Avaliação da expressão de iNOS por macrófagos derivados da medula óssea (MDMO). MDMO proveniente de camundongos C57BL/6, Ipaf KO, Naip5^{B6/AJ} e A/J foram plaqueados em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram positiva *B. subtilis*, em sua forma livre (FliC) ($3 \mu\text{g/ml}$) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) ($3 \mu\text{g/ml}$). Após 24 horas as células foram lisadas com SDS e a expressão de iNOS foi avaliada por *Western Blotting*, como descrito em *materiais e métodos*. Os dados representam dois experimentos demonstrativos de 3 experimentos.

Uma vez que mostramos a ativação de caspase-1 por FliC de *S. typhimurium*, decidimos verificar a participação dos receptores citosólicos na ativação da iNOS por ambas as formas da flagelina. Inicialmente, a utilização de MDMO de animais caspase-1 KO confirmou os dados obtidos com Z-YVAD, uma vez que a expressão de iNOS induzida tanto por FliC quanto por FliCDot foi quase que totalmente perdida nesses animais (Figura 11). Porém, enquanto a expressão de iNOS induzida por FliC se mostra completamente independente de Ipaf, com níveis semelhantes (e até maiores) àqueles encontrados nos animais C57BL/6, o

estímulo com FliCDot se mostra parcialmente dependente desse receptor. Mais uma vez, o envolvimento de Naip5 no reconhecimento da flagelina intracelular se mostra bastante evidente, uma vez que a expressão de iNOS induzida por FliCDot em MDMO de Naip5^{B6/AJ} não é observada nos MDMO de Naip5^{AJ/AJ}. De maneira interessante, níveis menores de iNOS foram encontrados nos MDMO de Naip5^{AJ/AJ} estimulados com FliC de *S. typhimurium* em relação aos MDMO de Naip5^{B6/AJ}. Uma vez que a expressão de β -actina é homogênea entre os grupos, podemos sugerir que o Naip5 também parece ter participação na ativação de iNOS por FliC de *S. typhimurium*.

Os dados, em conjunto, nos permitem especular que Naip5 e Ipaf estariam envolvidos na ativação da caspase-1 e conseqüente indução da expressão de iNOS por flagelina, um efeito até então desconhecido para esses receptores.

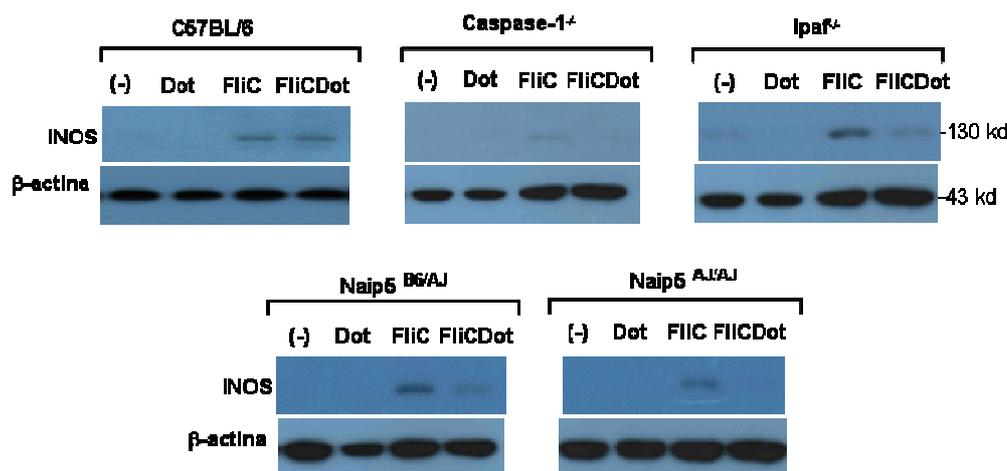


Figura 11: Avaliação da expressão de iNOS por macrófagos derivados da medula óssea (MDMO). MDMO proveniente de camundongos C57BL/6, Caspase-1 KO, Ipaf KO, Naip5^{B6/AJ} e Naip5^{AJ/AJ} foram plaqueados em placa contendo 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com RPMI, Dot, flagelina purificada proveniente da bactéria gram negativa *S. typhimurium*, em sua forma livre (FliC) (3 μ g/ml) ou inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) (3 μ g/ml). Após 24 horas as células foram lisadas com SDS e a expressão de iNOS foi avaliada por *Western Blotting*, como descrito em *materiais e métodos*. Os dados representam dois experimentos demonstrativos de três experimentos.

5 DISCUSSÃO

A flagelina, subunidade monomérica do flagelo presente em bactérias móveis, é uma das raras estruturas protéicas capazes de serem reconhecidas pelo sistema imune inato. Além de sua relação com a patogenicidade microbiana [40], a flagelina tem sido alvo de estudos envolvendo os receptores para padrões moleculares presentes em células da imunidade inata. Em 2001, a flagelina foi descrita como agonista de TLR5 [43] e, mais recentemente, a sua capacidade em ativar os receptores citosólicos Naip5 e Ipaf foi demonstrada utilizando diferentes linhagens bacterianas [19, 29, 30]. O reconhecimento citosólico da flagelina depende de sistemas de transporte, presentes em bactérias virulentas, como o sistema de secreção tipo III (TTSS) de *Salmonella* e do tipo IV (T4SS) de *Legionella* [19, 29, 30], que permite a inserção de produtos bacterianos, como a flagelina, no citosol.

A ativação de TLR5 por flagelina promove a mobilização do fator nuclear NF- κ B para o núcleo celular, estimulando a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, de maneira dependente da molécula adaptadora MyD88 [43]. As vias de sinalização induzidas pela ativação de Ipaf e Naip5 ainda não estão completamente elucidadas, porém, parece que esses receptores são capazes de recrutar e ativar a caspase-1 que, por sua vez, é necessária para a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e indução de um processo de morte celular programada e inflamatória, denominado piroptose [9, 13].

Edward Miao e colaboradores demonstraram que MØs derivados medula óssea (MDMO) provenientes de camundongos selvagens ou deficientes em TLR5 secretam IL-1 β em resposta à flagelina transfectada para o citosol, indicando que a produção de IL-1 β ocorre de maneira independente de TLR5 [13], [30, 35, 38]. Porém, o fato dos receptores do tipo Toll e do tipo Nod compartilharem os mesmos ligantes poderia sugerir uma cooperação entre os mesmos no intuito de otimizar o controle de infecções, aspectos que ainda não estão elucidados. Múltiplos são os fatores envolvidos no controle de patógenos influenciados por seu reconhecimento inicial por células do sistema imune inato. Sendo assim, ainda é um grande desafio no estudo da imunidade inata a identificação do papel individual e interativo entre os receptores inatos na ativação desses mecanismos

microbicidas. Para tentar elucidar alguns aspectos, esse trabalho foi delineado no intuito de avaliar as consequências da ativação de macrófagos peritoneais (MP) ou derivados de medula óssea (MDMO) por flagelina purificada da bactéria gram positiva *Bacillus subtilis*, em sua forma livre (FliC) ou inserida em vesículas lipídicas catiônicas (DOTAP – *dioleoyl trimethylammonium propane*) (FliCDot). Essas vesículas formam complexos estáveis, de maneira espontânea, quando adicionado a uma proteína. Esse complexo, por sua vez, adere-se à membrana celular, e então, as proteínas são liberadas no citoplasma. Essa estratégia tem sido amplamente empregada para a entrega de agonistas no citosol celular ou transfecção de material genético, em substituição a outros métodos como retrovirus, microinjeção e eletroporação, por apresentar menor citotoxicidade, alta reprodutibilidade e melhor distribuição do material transferido [77, 78].

O primeiro parâmetro da ativação de MØs avaliado foi a produção de IL-1 β tomando por base a dependência da caspase-1 neste processo. Inicialmente, utilizamos a flagelina da bactéria gram positiva *Bacillus subtilis*, no intuito de eliminar resíduos mínimos de LPS que poderiam conter durante a preparação da purificação da flagelina de *S. typhimurium*, o que poderia interferir em nossos resultados. De fato, ao contrário da flagelina livre (FliC), o estímulo com a flagelina intracelular (FliCDot) induziu a produção de altos níveis de IL-1 β por MP, de maneira dependente de caspase-1, uma vez que na presença de Z-YVAD (inibidor de caspase-1) a produção desta citocina foi inibida. Como a *Bacillus subtilis* é uma bactéria não patogênica, os efeitos de seu reconhecimento citosólico ainda não haviam sido estudados. Assim mostramos que a flagelina de *B. subtilis*, se presente no citosol, também ativa caspase-1.

O próximo passo foi verificar a indução de um mecanismo envolvido no controle de patógenos, sabidamente induzido por TLR, a enzima iNOS. Realmente, altos níveis de expressão de iNOS foram alcançados em resposta à FliC. Os níveis de NO, dosados pela determinação do nitrito acumulada na cultura, foram baixos, como já previamente demonstrado em MØs não primados [64]. Porém, esses níveis foram aumentados em até 4 vezes na presença das citocinas rIL-12 e rIL-18. O interessante e inesperado foi o fato do estímulo com FliCDot

também induzir a expressão de iNOS. Mais ainda, o efeito de FliCDot, e não de FliC, foi perdido na presença de Z-YVAD, mostrando a dependência da caspase-1 para a expressão de iNOS. Como o promotor gênico da iNOS contém sítios de ligação para dois fatores de transcrição, NF- κ B (ativado pela cascata intracelular dos TLR) e IRF-1 (induzido por IFN- γ) a sua ativação por caspase-1 ainda é um efeito desconhecido [82, 83]. Importante ressaltar que o estímulo com FliCDot induziu a expressão de iNOS tanto em MP quanto em MDMO, sendo este último, utilizado no intuito de eliminar a interferência de outros tipos de populações celulares, ainda que a população de MP utilizada em nossos estudos seja representada por 98% de células F4/80⁺.

Uma vez que Ipaf e Naip5 são os receptores presentes no citosol descritos como capazes de reconhecer a flagelina intracelular, utilizamos MØs *knockouts* para Ipaf e MØs mutantes para Naip5, para avaliar o papel desses receptores neste processo. A expressão de iNOS nessas células mostram o envolvimento de Ipaf, uma vez que a intensidade na expressão desta enzima foi menor em relação ao grupo controle, apesar da expressão de β -actina (gene constitutivo) ser homogênea entre os grupos. Pudemos ainda notar uma completa dependência de Naip5 para esse efeito, na expressão de iNOS por MDMO induzida por FliCDot .

O gene do Naip5 presente nos camundongos A/J não é completamente disfuncional. Nesse sentido, Zamboni e colaboradores identificaram o Naip5 como “sensor” intracelular chave no controle da *Legionella*, por um mecanismo dependente de caspase-1. Porém, outros trabalhos mostram que o estímulo com flagelina purificada na presença de SLO, uma proteína que permite a liberação de moléculas exógenas para o citosol de células vivas, induziu a expressão da caspase-1 em ambos os camundongos, C57BL/6 e A/J. Além disso, camundongos congênicos, que possuem fundo genético de um camundongo C57BL/6, entretanto carregam o gene permissivo (Naip5) do A/J, B6-Naip5A/J, também foram capazes de expressar a caspase-1 [37]. A mutação do gene Naip5 em camundongos A/J foi descrita em 1995 [86, 87], e todos os trabalhos da literatura relacionados ao Naip5 foram realizados em animais A/J ou com B6-Naip5A/J. Porém, muito recentemente Russel e colaboradores conseguiram desenvolver o camundongo

knockout para Naip5 [88]. Esses autores mostraram claramente que os animais Naip5KO são incapazes de ativar a caspase-1 e, portanto de secretar IL-1 β em resposta à *Legionella*, ao contrário dos animais A\J e B6-Naip5A/J, mostrando que o gene Naip5 presente nesses animais não é completamente disfuncional. A completa ausência de iNOS nesses MØs não deixa dúvidas do envolvimento de Naip5 neste parâmetro. Ainda, para minimizar os efeitos do *background*, utilizamos camundongos Naip5^{B6/AJ} (geração F4 do cruzamento entre C57BL/6 X A/J, com alelo Naip5 de C57BL/6) e Naip5^{AJ/AJ} (geração F4 do cruzamento entre C57BL/6 X A/J, com alelo Naip5 de A/J) para verificar o envolvimento de Naip5, uma vez que os animais *knockouts* apresentam o *background* genético dos animais C57BL/6.

Esses dados se tornam interessantes uma vez que sugerem que a piroptose, com conseqüente morte dos MØs pode não ser o único mecanismo efetor induzido por Ipaf e Naip5. Esse fato tem ainda mais relevância sob o ponto de vista de bactérias patogênicas. Assim, também estudamos as conseqüências da ativação de MØs frente ao estímulo com flagelina de *Salmonella typhimurium*, uma bactéria gram negativa, patogênica na qual tanto o NO quanto a piroptose parecem atuar em seu controle [89, 90].

Os dados obtidos com FliCDot de *S. typhimurium* foram bastante semelhantes, onde tanto IL-1 β como iNOS se mostraram dependentes de caspase-1. Ainda para esta flagelina, Ipaf e Naip5 parecem estar envolvidos. A participação de Ipaf na indução de iNOS com flagelina de *Salmonella* foi mais evidente do que a flagelina de *B. subtilis*. Porém vimos que a flagelina extracelular de *S. typhimurium* parece induzir a ativação da caspase-1, uma vez que esta foi capaz de induzir a produção IL-1 β por MP. Ainda, a expressão de iNOS, induzida por FliC foi dependente da ativação de caspase-1, já que observamos uma diminuição desta expressão na presença de Z-YVAD. Esses resultados foram confirmados utilizando MØs *knockouts* para esta protease onde mostramos claramente uma diminuição acentuada na expressão de iNOS, tanto em resposta ao estímulo com FliC quanto em resposta ao estímulo com FliCDot.

O fato da flagelina livre, apenas de *S. typhimurium*, induzir a produção de IL-1 β pode ser reflexo da inserção desta no citosol da célula, de maneira espontânea, ou seja, sem ferramentas como DOTAP. Isto poderia ser explicado pelas diferenças na estrutura das duas flagelinas estudadas. Sabe-se que as seqüências de aminoácidos presentes na região N-terminal e C-terminal das flagelinas são as regiões conservadas, reconhecidas pelos receptores TLR5 e IpaF/Naip5, respectivamente. No entanto, enquanto a flagelina de *Salmonella* tem 495 aminoácidos, a flagelina de *B. subtilis* tem 308, mostrando que as seqüências entre as porções N e C-terminal são distintas entre si. E, como a seqüência que permite a entrada da flagelina no citosol não está nem na porção N-terminal nem na porção C-terminal, essas seqüências distintas entre as flagelinas, porém bem maior na flagelina de *Salmonella*, poderia conter os aminoácidos necessários para a entrada na célula [91, 92].

Porém, apesar da dependência da caspase-1, a expressão de iNOS a partir do estímulo com FliC se mostrou completamente independente de IpaF e apenas uma pequena diminuição nesta expressão foi observada em MØs Naip5^{AJ/AJ}, em comparação com Naip5^{B6/AJ}. Não conseguimos entender esse efeito, apenas especular um possível mecanismo compensatório de receptores TLRs que mantém níveis altos da expressão de iNOS pela via MYD88-NF- κ B.

Dessa forma, entendemos que IpaF e Naip5 estariam reconhecendo a flagelina e induzindo a ativação da caspase-1, que por sua vez, de maneira ainda desconhecida, estaria induzindo a expressão de iNOS. Como verificamos que o estímulo com FliC_{Dot} também foi capaz de ativar NF- κ B, podemos especular que a ativação da iNOS induzida por caspase-1 envolva esse fator de transcrição.

Sabe-se que a flagelina intracelular ativa o receptor IpaF que, em conjunto com a molécula adaptadora ASC, formam um complexo multiprotéico, o inflamasoma, capaz de recrutar e ativar a caspase-1, através de interações CARD-CARD [36]. Apesar do inflamasoma IpaF ser o melhor caracterizado na literatura, pouco se sabe sobre o receptor Naip5, que ao invés do domínio CARD, este receptor possui um domínio efetor do tipo BIR, sugerindo que Naip5 necessita da interação com outras moléculas que apresentem o domínio CARD

para ativar a caspase-1, como já foi mostrado sua interação com Ipaf e ASC [19, 93]. Assim, a ativação de NF- κ B a partir do reconhecimento da flagelina citosólica por Naip5, poderia ser resultado da interação desse receptor com outras moléculas adaptadoras, como Rip2, essencial para ativação de NF- κ B por NOD1 e NOD2 [94].

Além disso, podemos postular a influência da IL-1 β e IL-18, citocinas pró-inflamatórias induzidas pela caspase-1. Nesse sentido, o único trabalho encontrado na literatura relacionado caspase-1 com ativação de iNOS, corrobora a influência da IL-1 β nesse aspecto, ainda que em um modelo bastante distinto do nosso [58]. Eric e colaboradores mostraram que a ativação iNOS em astrócitos (AC) e células endoteliais do cérebro (BEC) por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , dependem da disponibilidade de IL-1 β ativa, assim como da atividade da caspase-1 (ICE) [58]. Sendo assim a avaliação da influência de IL-1 β se torna o próximo passo no desenrolar desse trabalho.

6 CONCLUSÃO

- Flagelina purificada de *B. subtilis*, inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) que permitem a sua entrega no citosol celular, induz a produção de IL-1 β e ativação de iNOS em macrófagos, de maneira dependente de caspase-1.
- Flagelina purificada de *S. typhimurium* em suas formas livre (FliC) e inserida em vesículas lipídicas DOTAP (FliCDot) induzem a produção de IL-1 β e expressão de iNOS em macrófagos, por um mecanismo dependente de caspase-1.
- A indução da expressão de iNOS em macrófagos por FliCDot de *B. subtilis* e *S. typhimurium* envolve os membros da família NLR, Naip5 e Ipaf.
- O mecanismo pelo qual a via Naip5/Ipaf-caspase-1 induz a expressão de iNOS não está elucidado, porém parece envolver o fator de transcrição NF- κ B.
- Os dados em conjunto sugerem uma nova via de ativação de iNOS, aparentemente envolvendo o reconhecimento citosólico da flagelina pelos receptores Naip5 e Ipaf, culminando na ativação da caspase-1. A caspase-1, por sua vez, por um mecanismo ainda não elucidado, induziria a ativação de NF- κ B, resultando na expressão de iNOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] van Furth R. Monocyte production during inflammation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1985;8(2):205-11.
- [2] Volkman A, Gowans JL. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br J Exp Pathol*. 1965 Feb;46:62-70.
- [3] Unanue ER. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev*. 1997 Aug;158:11-25.
- [4] Villacres-Eriksson M. Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. *Clin Exp Immunol*. 1995 Oct;102(1):46-52.
- [5] Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
- [6] Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975 Jan;78(1):71-100.
- [7] Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr., Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*. 1977 Oct 27;269(5631):804-6.
- [8] Werb Z, Gordon S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J Exp Med*. 1975 Aug 1;142(2):346-60.
- [9] Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003 Aug;15(4):396-401.
- [10] McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol*. 2005 Feb;17(1):18-24.
- [11] Greaves DR, Gordon S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res*. 2005 Jan;46(1):11-20.
- [12] Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):355-6.
- [13] Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*. 2006 Oct;7(10):1074-81.
- [14] Yamamoto M, Akira S. [TIR domain--containing adaptors regulate TLR-mediated signaling pathways]. *Nippon Rinsho*. 2004 Dec;62(12):2197-203.
- [15] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007 Feb;19(1):24-32.

- [16] Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):371-82.
- [17] Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:447-80.
- [18] Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):213-8.
- [19] Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):318-25.
- [20] Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):803-14.
- [21] Van der Biezen EA, Jones JD. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*. 1998 Dec;23(12):454-6.
- [22] Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:355-83.
- [23] Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*. 2003 Jul;4(7):702-7.
- [24] Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5509-12.
- [25] Girardin SE, Yaniv M. A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1-induced JNK activation. *Embo J*. 2001 Jul 2;20(13):3437-46.
- [26] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):417-26.
- [27] Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):233-6.
- [28] Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005 Aug;26(8):447-54.

- [29] Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, Brady G, et al. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):35217-23.
- [30] Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):576-82.
- [31] Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 2007 Sep;14(9):1583-9.
- [32] Mariathasan S. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect*. 2007 Apr;9(5):664-71.
- [33] Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):659-62.
- [34] Ren T, Zamboni DS, Roy CR, Dietrich WF, Vance RE. Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog*. 2006 Mar;2(3):e18.
- [35] Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):1093-104.
- [36] Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, Dunipace EA, et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol*. 2008 Oct;9(10):1171-8.
- [37] Lamkanfi M, Amer A, Kanneganti TD, Munoz-Planillo R, Chen G, Vandenabeele P, et al. The Nod-like receptor family member Naip5/Birc1e restricts Legionella pneumophila growth independently of caspase-1 activation. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):8022-7.
- [38] Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*. 2007 Sep;29(3):275-88.
- [39] Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:77-100.
- [40] Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, et al. Role of flagella in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection. *Infect Immun*. 1998 Jan;66(1):43-51.

- [41] Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*. 2003 Aug 7;424(6949):643-50.
- [42] Reichhart JM. TLR5 takes aim at bacterial propeller. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1159-60.
- [43] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1099-103.
- [44] Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1247-53.
- [45] Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol*. 2007 Feb;19(1):1-3.
- [46] Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1;97(16):8841-8.
- [47] Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*. 1997 Jun 15;99(12):2818-25.
- [48] Stasia MJ, Cathebras P, Lutz MF, Durieu I. [Chronic-granulomatous disease.]. *Rev Med Interne*. 2008 Jul 18.
- [49] Schappi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause KH. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol*. 2008 Jul;30(3):255-71.
- [50] Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*. 1998 Mar;66(3):1208-15.
- [51] Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, et al. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):29-38.
- [52] Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog*. 2007 Aug 10;3(8):e111.

- [53] Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):372-9.
- [54] Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2562-7.
- [55] Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005 Apr;73(4):1907-16.
- [56] Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol*. 2007 Nov;9(11):2562-70.
- [57] Brough D, Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci*. 2007 Mar 1;120(Pt 5):772-81.
- [58] Juttler E, Bonmann E, Spranger M, Kolb-Bachofen V, Suschek CV. A novel role of interleukin-1-converting enzyme in cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: Implications for neuroinflammatory diseases. *Mol Cell Neurosci*. 2007 Apr;34(4):612-20.
- [59] Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):984-93.
- [60] Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989 Sep 1;170(3):827-45.
- [61] Puccetti P, Belladonna ML, Grohmann U. Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev Immunol*. 2002;22(5-6):373-90.
- [62] Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect*. 2004 May;6(6):630-6.
- [63] Bogdan C, Schleicher U. Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy? *Trends Immunol*. 2006 Jun;27(6):282-90.
- [64] Bastos KR, Alvarez JM, Marinho CR, Rizzo LV, Lima MR. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *J Leukoc Biol*. 2002 Feb;71(2):271-8.
- [65] Bastos KR, de Deus Vieira de Moraes L, Zago CA, Marinho CR, Russo M, Alvarez JM, et al. Analysis of the activation profile of dendritic cells derived from

the bone marrow of interleukin-12/interleukin-23-deficient mice. *Immunology*. 2005 Apr;114(4):499-506.

[66] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995 Nov 2;378(6552):88-91.

[67] Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol*. 2000 Jan 1;164(1):64-71.

[68] Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages. *J Leukoc Biol*. 2000 Nov;68(5):707-14.

[69] Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*. 1998 Jun 15;187(12):2103-8.

[70] Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*. 2001 Oct;22(10):556-60.

[71] Schindler H, Bogdan C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol*. 2001 Aug;1(8):1443-55.

[72] Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res*. 2007 May;27(5):399-410.

[73] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:11-8.

[74] Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science*. 1997 Jan 10;275(5297):206-9.

[75] Totemeyer S, Sheppard M, Lloyd A, Roper D, Dowson C, Underhill D, et al. IFN-gamma enhances production of nitric oxide from macrophages via a mechanism that depends on nucleotide oligomerization domain-2. *J Immunol*. 2006 Apr 15;176(8):4804-10.

[76] Coers J, Vance RE, Fontana MF, Dietrich WF. Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol*. 2007 Oct;9(10):2344-57.

- [77] Walker C, Selby M, Erickson A, Cataldo D, Valensi JP, Van Nest GV. Cationic lipids direct a viral glycoprotein into the class I major histocompatibility complex antigen-presentation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 1;89(17):7915-8.
- [78] Chen W, Carbone FR, McCluskey J. Electroporation and commercial liposomes efficiently deliver soluble protein into the MHC class I presentation pathway. Priming in vitro and in vivo for class I-restricted recognition of soluble antigen. *J Immunol Methods*. 1993 Mar 15;160(1):49-57.
- [79] Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988 Oct 1;141(7):2407-12.
- [80] Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via IpaB. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):569-75.
- [81] Suzuki T, Nunez G. A role for Nod-like receptors in autophagy induced by Shigella infection. *Autophagy*. 2008 Jan-Feb;4(1):73-5.
- [82] Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 15;90(20):9730-4.
- [83] Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science*. 1994 Mar 18;263(5153):1612-5.
- [84] Khan MA, Bouzari S, Ma C, Rosenberger CM, Bergstrom KS, Gibson DL, et al. Flagellin-dependent and -independent inflammatory responses following infection by enteropathogenic Escherichia coli and Citrobacter rodentium. *Infect Immun*. 2008 Apr;76(4):1410-22.
- [85] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6166-73.
- [86] Beckers MC, Yoshida S, Morgan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with Legionella pneumophila: chromosomal localization of the Lgn1 susceptibility gene. *Mamm Genome*. 1995 Aug;6(8):540-5.
- [87] Dietrich WF, Damron DM, Isberg RR, Lander ES, Swanson MS. Lgn1, a gene that determines susceptibility to Legionella pneumophila, maps to mouse chromosome 13. *Genomics*. 1995 Apr 10;26(3):443-50.

- [88] Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, Dunipace EA, et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol*. 2008 Aug 24.
- [89] Cherayil BJ, Antos D. Inducible nitric oxide synthase and Salmonella infection. *Microbes Infect*. 2001 Jul;3(9):771-6.
- [90] Cherayil BJ, McCormick BA, Bosley J. Salmonella enterica serovar typhimurium-dependent regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages by invasins SipB, SipC, and SipD and effector SopE2. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5567-74.
- [91] Asano Y, Onishi H, Tajima K, Shinozawa T. Flagellin as a biomarker for *Bacillus subtilis* strains; application to the DB9011 strain and the study of interspecific diversity in amino-acid sequences. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2001 May;65(5):1218-22.
- [92] McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 2001 Oct 25;413(6858):852-6.
- [93] Damiano JS, Oliveira V, Welsh K, Reed JC. Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem J*. 2004 Jul 1;381(Pt 1):213-9.
- [94] Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):798-815.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)