

BRUNO JENNINGS DE ALMEIDA

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO INFLAMOSSOMO
NLRP3 E SEUS MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DURANTE
A PERITONITE INDUZIDA POR *Bacteroides fragilis* E
CONTEÚDO CECAL ESTÉRIL



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
pré-requisito para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2016

Trabalho realizado no Laboratório de Imunobiologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Professora Ana Carolina Oliveira e coorientação de Juliana Pandini Castelpoggi.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNO JENNINGS DE ALMEIDA

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO INFLAMOSSOMO NLRP3 E SEUS MECANISMOS DE
ATIVACÃO DURANTE A PERITONITE INDUZIDA POR *Bacteroides fragilis* E
CONTEÚDO CECAL ESTÉRIL

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2016

Dr. Leandro Araújo Lobo (Presidente)
Professor adjunto do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, UFRJ

Dra. Alessandra D'Almeida Filardy (Membro)
Professora adjunta do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, UFRJ

Dr. Fabianno Ferreira Dutra (Membro)
Pós-doutorando do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, UFRJ

Dr. Fábio Barrozo do Canto (Suplente)
Professor substituto do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, UFRJ

DEDICATÓRIA



Dedico essa monografia a meus bisavós Manuel e Mariana, obrigado por todos os ensinamentos dados a mim durante a minha vida. Sem vocês eu e nossa família nada seríamos.

Por mais que doa a ausência de vocês todos os dias, quero sempre lembrar dessas carinhas felizes, pois assim vocês eram sempre. Nunca deixavam se abater facilmente por nada e esse é um dos ensinamentos mais importantes que vocês me deram.

Obrigado por sempre acreditarem em mim e me darem força para sonhar e conquistar meus objetivos, sei que de onde vocês estiverem estão torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

As palavras que aqui escrevo não chegam perto de tudo o que eu sinto por todas as pessoas contidas nesse agradecimento. Antes de mais nada quero dizer que todos vocês foram muito importantes ao longo da minha vida e desses quatro anos de faculdade.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe, Karla, por tudo que fez na vida para conseguir com que eu chegasse até aqui, todo o esforço feito para me criar da melhor forma possível e me ajudar a realizar meus sonhos, eu não seria nada sem você em minha vida.

Gostaria também de agradecer aos meus avós Rodrigo, Imelda e Daisy, por toda a educação que me deram e por tudo que fizeram por mim para me ajudar a chegar até aqui.

Quero agradecer, ao Rodrigo, que muito mais que meu namorado, foi um companheiro acima de tudo, obrigado por me aguentar nessa fase final em que eu estava insuportável e surtando por causa da monografia.

Não posso esquecer de incluir nesse agradecimento a minha orientadora Carol, obrigado por esses 3 anos de ensinamento, ajuda e paciência. Sem você e sua ajuda, esse projeto não seria totalmente realizado, obrigado por acreditar em mim e permitir que eu fizesse parte desse projeto e desenvolvesse esse trabalho.

Minha eterna “chuchu”, Juliana, você foi a melhor coorientadora que eu poderia ter, obrigado pela paciência, pelas risadas e pelos puxões de orelha dados. Sem você, muito do conhecimento que eu adquiri não seria adquirido.

À minha família, que me deu suporte e forças para sempre seguir em frente e perseguir meus sonhos.

E não podendo esquecer dos amigos que fiz nesse tempo em que estive na UFRJ, tanto no laboratório quanto em sala de aula. Anna Beatriz, Ana Gabriela, Diogo, Erick, Fábio, Manuela, Sidcley, sem vocês as aulas não teriam sido as mesmas, os trabalhos em grupos não seriam divertidos e sem comentar das festas que sem vocês não são as mesmas. Aos meus amigos Jean, Yasmin e Aline, agradeço por todas as risadas que demos juntos. Às minhas meninas Scarlathe, Luiza, Thais, Tamires e Quezia que mesmo tendo nos aproximado mais para o fim da faculdade, vocês têm um lugar muito importante na minha vida. Se esqueci algum amigo, me perdoe, agradeço a vocês também.

A todos os meus amigos do laboratório, Rafael, Thayanne, Ingrid, Janaina, Cyntia, Rafaela, Isabela, Camila, Julia, Leticia, Lucas, Thais, Rafael Guilherme, Leandro, Dani, Leila e Carlinha, agradeço a alegria de todos os dias.

Por fim, agradeço às agências de fomento por todo o suporte financeiro dado para ajudar na realização deste trabalho e aos professores Maria Bellio, Dario Zamboni e Robson Coutinho, por cederem animais que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

A todos vocês, MUITO OBRIGADO!

RESUMO

BRUNO JENNINGS DE ALMEIDA

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO INFLAMOSSOMO NLRP3 E SEUS MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DURANTE A PERITONITE INDUZIDA POR *Bacteroides fragilis* E CONTEÚDO CECAL ESTÉRIL

ORIENTADORA: ANA CAROLINA OLIVEIRA

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Peritonite é a inflamação da cavidade peritoneal causada pelo extravasamento do conteúdo intestinal, através da ruptura de barreiras físicas ou por doenças intestinais já estabelecidas. Quando há esse extravasamento, bactérias provenientes da microbiota, como a espécie *Bacteroides fragilis* e produtos da dieta, são capazes de desencadear um processo inflamatório intenso, resultante de mecanismos de defesa do hospedeiro frente à essa injúria. Um dos principais modelos experimentais de peritonite murina consiste no inóculo intraperitoneal de *B. fragilis* e um agente potencializador, como o conteúdo cecal estéril (CCE). Utilizando este modelo, dados prévios do nosso grupo mostraram que animais deficientes no receptor da citocina IL-1 apresentam um fenótipo protetor durante o desenvolvimento da peritonite. Observou-se também, tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo*, que o CCE sozinho, mas não *B. fragilis*, induz a produção de IL-1 β . De fato a IL-1 β é uma das principais citocinas produzidas durante a peritonite, e sua secreção depende da ativação de inflamossomos. Visto isso, o objetivo deste projeto foi avaliar o papel do inflamossomo NLRP3 na produção de IL-1 β induzida por CCE e no desenvolvimento da peritonite, e esclarecer seu (s) mecanismo (s) de ativação. Inicialmente, observamos que a produção de IL-1 β induzida por CCE é completamente dependente de NLRP3, e que esta via contribui para o desenvolvimento da peritonite, já que animais nocautes para ASC, Caspase-1 e NLRP3 apresentaram atenuação da perda de peso e menor *score* de abscessos, assim como previamente observado para animais IL-1RKO, quando comparados a animais selvagens. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ativação, investigamos o papel do receptor purinérgico de ATP extracelular, o P2X₇, uma vez que esta via é uma das principais ativadoras de NLRP3. Utilizando células de animais deficientes neste receptor, observamos que há uma dependência parcial de P2X₇ na secreção de IL-1 β por macrófagos e células dendríticas *in vitro*, embora a ausência deste receptor não tenha influenciado no desenvolvimento de peritonite *in vivo*. Em seguida, utilizando diversos inibidores farmacológicos, observamos que fagocitose, catepsina B lisossomal, efluxo de potássio e ROS mitocondrial são determinantes para a secreção de IL-1 β induzida por CCE. Esses resultados sugeriram que um componente particulado desse conteúdo, como a fibra não digerível proveniente da dieta, estaria levando a ativação do inflamossomo e produção de IL-1 β . Utilizando CCE obtido de animais alimentados com dietas apresentando diferentes teores de fibra, observamos que células estimuladas com o CCE rico em fibra (15%) apresentaram uma maior produção de IL-1 β quando comparadas ao CCE controle (4,5%), e que esse aumento na produção é dependente de NLRP3. Por outro lado, a ausência de fibra na dieta reduz significativamente a produção de IL-1 β , enquanto que a produção de TNF- α não é afetada.

Confirmando esses resultados, animais inoculados com *B. fragilis* e CCE rico em fibra apresentaram maior *score* de abscessos e maior porcentagem de perda de peso quando comparados aos animais inoculados com a bactéria na presença de CCE controle, mostrando a importância da fibra para o desenvolvimento da peritonite. Corroborando esses dados, observamos que fibra purificada induz a produção de IL-1 β em macrófagos primados com LPS de forma dependente de NLRP3. Juntos, esses resultados sugerem que o inflamossomo NLRP3 é essencial para a secreção de IL-1 β e consequente desenvolvimento da peritonite, possivelmente por ser ativado pela fibra não digerível proveniente da dieta.

Palavras-chave: peritonite, *Bacteroides fragilis*, interleucina-1 beta, inflamossomo, fibras na dieta.

ABSTRACT

BRUNO JENNINGS DE ALMEIDA

STUDY OF THE ROLE OF NLRP3 INFLAMMASOME AND ITS ACTIVATION MECHANISMS DURING PERITONITIS INDUCED BY *Bacteroides fragilis* AND STERILE CECAL CONTENT

SUPERVISOR: ANA CAROLINA OLIVEIRA

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Peritonitis is the inflammation of the peritoneal cavity caused by the leakage of intestinal content, through the rupture of physical barriers or by inflammatory intestinal diseases. When the intestinal content overflows, bacteria from microbiota, as *Bacteroides fragilis* and dietary products promote a severe inflammatory process, due to the host defense mechanisms acting against such damage. The main experimental model of murine peritonitis consists in the intraperitoneal inoculation of *B. fragilis* in combination with a potentializing agent, such as sterile cecal content (SCC). Using this model, previous data from our group showed that IL-1 receptor- deficient mice exhibit a protective phenotype during the peritonitis. It was also observed, both in *in vivo* and *in vitro* experiments, that SCC alone, but not *B. fragilis*, induces IL-1 β production. In fact, IL-1 β is one of the main cytokines produced during peritonitis, and its secretion depends on inflammasome activation. Therefore, the aim of this project was to evaluate the role of NLRP3 inflammasome in the production of IL-1 β induced by SCC and peritonitis development, and identifying its activation mechanisms. Initially, we observed that the IL-1 β production induced by SCC is completely dependent on NLRP3, and this pathway contributes to peritonitis development, since ASC, Caspase-1 and NLRP3 knockout mice show mitigation in weight loss and lower abscess scores, as previously observed for IL-1RKO. In attempt to investigate the NLRP3 activation mechanism, we analyzed the role of extracellular ATP through signaling by purinergic receptor P2X₇, since ATP is one of the main activators of NLRP3. By utilizing cells from P2X₇^{-/-} mice, we noticed that there is a partial requirement for P2X₇ in the IL-1 β secretion by macrophages and dendritic cells, despite of normal peritonitis development *in vivo*. Then, by using various pharmacological inhibitors, we observed that phagocytosis, lysosomal cathepsin B, potassium efflux and mitochondrial ROS are relevant for IL-1 β secretion induced by SCC. These results suggest that a particulate component from SCC, as non-digestible fiber from diet, would lead to inflammasome activation and IL-1 β production. By using SCC from mice fed on diets containing different fiber levels, we observed that cells stimulated by high fiber SCC (15%) show higher IL-1 β production when compared to control SCC (4,5%), and this increase is completely dependent on NLRP3. On the other hand, the absence of fiber in the diet significantly reduces the IL-1 β levels, while the TNF- α production is unaltered. According, inoculation of *B. fragilis* in combination with high fiber SCC induces higher abscess score and more prominent weight loss, revealing an essential role of dietary fiber to peritonitis development. Corroborating these data, we also observed that purified fiber induces IL-1 β production by LPS-primed macrophages in a NLRP3-dependent manner. Together, these results

suggest that the NLRP3 inflammasome is essential to IL-1 β secretion and consequent peritonitis development, possibly because it is activated by non-digestible dietary fiber..

Keywords: peritonitis, *Bacteroides fragilis*, interleukin-1 beta, inflammasome, dietary fiber.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Regiões do corpo humano colonizadas por bactérias e quantidade de bactérias em diferentes sítios do TGI	3
Figura 2. Estrutura do PSA de <i>B. fragilis</i>	5
Figura 3. Membrana externa de uma bactéria Gram negativa e representação da estrutura do LPS	6
Figura 4. Modelo de formação de abscessos intra-abdominais induzido por <i>B. fragilis</i>	8
Figura 5. Interações proteicas nos inflamossomos	11
Figura 6. Ausência de IL-1R protege os camundongos da peritonite induzida por <i>B. fragilis</i> e CCE	12
Figura 7. CCE, mas não <i>B. fragilis</i> , induz <i>in vivo</i> a secreção de IL-1 β	13
Figura 8. CCE, mas não <i>B. fragilis</i> , induz a secreção de IL-1 β <i>in vitro</i> por macrófagos	13
Figura 9. CCE induz a secreção de IL-1 β por macrófagos e células dendríticas <i>in vitro</i> de maneira dose dependente	14
Figura 10. Ativadores de NLRP3	15
Figura 11. Principais hipóteses para a ativação do inflamossomo NLRP3	18
Figura 12. A produção de IL-1 β induzida por CCE é dependente da expressão de componentes do inflamossomo NLRP3	27
Figura 13. O eixo NLRP3-caspase-1-IL-1R é essencial para o desenvolvimento da peritonite	28
Figura 14. A secreção de IL-1 β induzida por CCE é parcialmente dependente da sinalização via receptor purinérgico P2X7 em macrófagos e células dendríticas	28
Figura 15. Sinalização via P2X ₇ não é essencial para o desenvolvimento de peritonite	31
Figura 16. Fagocitose, catepsina lisossomal, ROS mitocondrial e efluxo de potássio são mecanismos essenciais para a produção de IL-1 β induzida por CCE	32
Figura 17. Material particulado presente no CCE é essencial para a indução de IL-1 β	33
Figura 18. Material particulado presente no CCE é essencial para o desenvolvimento de peritonite	34
Figura 19. Fibra presente no CCE contribui para a secreção de IL-1 β	36
Figura 20. A fibra da dieta leva a ativação do inflamossomo NLRP3 e secreção de IL-1 β	37
Figura 21. Teor de fibra do CCE é essencial para o desenvolvimento da peritonite	38
Figura 22. Fibra purificada é capaz de ativar a caspase-1 e levar a produção de IL-1 β em macrófagos primados com LPS	40
Figura 23. A indução de IL-1 β por CCE ocorre de forma independente de caspase-11	41
Figura 24. CCE induz liberação de LDH em macrófagos de forma independente de NLRP3	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta controle fornecida aos camundongos	Página 22
---	--------------

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AMP	Adenosina monofosfato
APCs	Célula apresentadora de antígeno
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
ASS	Ágar Sangue Suplementado
ATP	Adenosina trifosfato
BBE	<i>Bacteroides</i> Bile Esculina
Bf	<i>Bacteroides fragilis</i>
BFT	<i>Bacteroides fragilis</i> toxin
BHI	<i>Brain-heart infusion</i>
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cells</i>
BMDM	<i>Bone marrow derived macrophages</i>
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domains</i>
CCE	Conteúdo cecal estéril
CPC	Complexo polissacarídico capsular
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern molecules</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
Fig.	Figura
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL1R	Receptor para IL-1
K⁺	Íon potássio
KO	<i>Knockout</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRs	<i>Leucine Rich Repeats</i>
MAMPs	<i>Microbe-associated molecular pattern</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
ME	Membrana externa
MFI	<i>Mean of fluorescence intensity</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLRP	<i>Nucleotide binding domain, Leucine rich repeat, Pyrin domain containing</i>
Nlrc	NLR family, CARD domain containing
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PME	Proteína de membrana externa
PMN	Polimorfonuclear
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PSA	Polissacarídeo A
PSs	Polissacarídeos

PYD	<i>Pyrin domain</i>
PYG	<i>Peptone Yeast Extract Broth with Glucose</i>
RE	Retículo endoplasmático
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TGI	Trato gastrointestinal
Th	<i>T “helper”</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNFR	Receptor para TNF
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRX	Tioredoxina
TXNIP	<i>Thioredoxin interacting protein</i>
WT	<i>Wild-type</i>

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Peritonite	1
1.2. Microbiota	2
1.3. Gênero <i>Bacteroides</i>	4
1.4. Espécie <i>Bacteroides fragilis</i> e a fisiopatologia dos abscessos	4
1.5. IL-1 β e inflamossomos	8
1.6. Inflamossomo NLRP3	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Cepa bacteriana e condições de cultivo	21
4.2. Animais	21
4.3. Dietas fornecidas aos animais	22
4.4. Preparo do conteúdo cecal estéril (CCE)	22
4.5. Indução de abscessos intra-abdominais	22
4.6. Avaliação da perda de peso	23
4.7. Avaliação dos abscessos intra-abdominais	23
4.8. Obtenção de macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea	23
4.9. ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) para a quantificação de citocinas	24
4.10. Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH)	24
4.11. Ensaio de FLICA para a detecção de caspase-1 ativa	25
4.12. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	25
5.1. A produção de IL-1 β induzida por CCE é dependente da expressão de componentes do inflamossomo NLRP3	25
5.2. O eixo NLRP3-Caspase-1-IL-1R é essencial para o desenvolvimento da peritonite	27
5.3. A secreção de IL-1 β induzida por CCE é parcialmente dependente da sinalização via receptor purinérgico P2X ₇ em macrófagos e células dendríticas	28
5.4. Sinalização via P2X ₇ não é essencial para o desenvolvimento de peritonite	30
5.5. Fagocitose, catepsina lisossomal, ROS mitocondrial e efluxo de potássio são mecanismos essenciais para a produção de IL-1 β induzida por CCE	31
5.6. Material particulado presente no CCE é essencial para indução de IL-1 β	33
5.7. Material particulado presente no CCE é essencial para o desenvolvimento de peritonite	33
5.8. Fibra presente no CCE contribui para a secreção de IL-1 β	34
5.9. Teor de fibra do CCE é essencial para o desenvolvimento da peritonite	37
5.10. Fibra purificada é capaz de ativar caspase-1 e levar a produção de IL-1 β em macrófagos primados com LPS	38
5.11. A indução de IL-1 β por CCE ocorre de forma independente de caspase-1	40
5.12. CCE induz liberação de LDH em macrófagos de forma independente de NLRP3	42
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peritonite

Peritonite é uma inflamação da cavidade peritoneal e do peritônio, uma membrana serosa estéril que protege as vísceras. Quando ocorre a invasão deste sítio por microrganismos, é iniciada uma resposta inflamatória intensa, que é o mecanismo principal de defesa do hospedeiro frente a infecções. Essa infecção causada na cavidade peritoneal pode desencadear diversas complicações, como o surgimento de abscessos intra-abdominais, que eventualmente podem evoluir para a sepse (Sartelli *et al.*, 2012). A peritonite é uma condição grave, pois está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade (cerca de 10% em pacientes jovens e saudáveis e cerca de 40 a 60% em pacientes idosos ou com doença subjacente significativa), e essas altas taxas estão presentes mesmo com o uso de antibioticoterapia (Sawyer *et al.*, 2015).

Para haver o estabelecimento de infecção na cavidade peritoneal, geralmente, é necessário que haja uma ruptura de barreiras físicas dos órgãos do trato gastrointestinal (TGI), como o intestino, levando ao extravasamento de seu conteúdo. Após essa ruptura, produtos da dieta e componentes da microbiota intestinal do hospedeiro alcançam sítios anteriormente estéreis do corpo. Este extravasamento pode acontecer em decorrência de diversos fatores, como por exemplo, infecções do TGI já estabelecidas, doenças inflamatórias intestinais, inflamações locais como diverticulite e apendicite e até durante a realização de exames ou intervenções médicas (Weledji e Ngowe, 2013). Como já foi supracitado, há a necessidade do extravasamento do conteúdo intestinal para o estabelecimento dessas infecções. Visto isso, pode-se afirmar que os principais microrganismos causadores das peritonites são provenientes da microbiota do TGI (Malangoni e Inui, 2006).

O sucesso da infecção é possível pois existem diversos fatores bacterianos que contribuem para isso, como, por exemplo, a produção de toxinas, a presença de cápsula, resistência a antimicrobianos, entre outros. Por outro lado, fatores do hospedeiro que auxiliam no controle dessas infecções, irão ajudar a conter a disseminação bacteriana (Brook, 2008). Uma das respostas desenvolvidas pelo hospedeiro para a contenção da infecção é a formação de abscessos intra-abdominais, os quais restringem as bactérias em seu interior, prevenindo a disseminação das mesmas para o sangue e impedindo o desenvolvimento de sepse, embora ainda haja a possibilidade da ruptura desses abscessos, resultando em infecções disseminadas. Geralmente, a composição dos abscessos é polimicrobiana, onde a maioria das bactérias presentes são Gram negativas e

anaeróbias facultativas (Rodrigues *et al.*, 2005). Bactérias como *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Clostridium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e enterococos são as mais comumente encontradas nesses abscessos em murinos (Levison e Bush, 1990; Walker e Condon, 1991; Zaleznik e Kasper, 2001; Carneiro *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2005).

Caso haja o desenvolvimento de abscessos na cavidade peritoneal, há a necessidade de remoção destes abscessos e tratamento com antibióticos, de modo que, quando não há uma terapia completa, a taxa de mortalidade pode chegar a 60% (Wexler, 2007). Em pacientes considerados como tendo infecção grave, a cirurgia é muitas vezes requerida para impedir o progresso da infecção, drenar o processo purulento localizado na cavidade e reestabelecer o fluxo sanguíneo para o local, a fim de haver a entrega de agentes antimicrobianos adequados, como fármacos, que irão agir de forma a eliminar os patógenos causadores da infecção. (Aldridge, 1995).

1.2. Microbiota

O corpo humano é colonizado, em diversos sistemas e órgãos, por bactérias que vivem de forma comensal com o organismo (**Figura 1**), sendo o TGI o sistema com a maior quantidade de microrganismos vivendo em simbiose. Cerca de 10^{14} bactérias de 500 espécies diferentes o colonizam, sendo que de todas essas bactérias, cerca de 90% pertencem a dois filos do domínio das bactérias: Firmicutes e Bacteroidetes (Lobo, Benjamim e Oliveira, 2016).

O TGI começa a ser colonizado a partir do nascimento do indivíduo durante o parto, quando a microbiota da mãe é passada para o filho. Essa microbiota é modificada durante toda a vida do indivíduo por fatores externos como o tipo de alimentação, o uso de antibióticos, fatores ambientais e também por fatores internos, como os genéticos (Maslowski e Mackay, 2011).

A importância da presença e da composição da microbiota intestinal para o organismo hospedeiro fica evidente quando animais *germ-free*, livres de qualquer microrganismo são estudados. Estes animais apresentam deficiências no desenvolvimento do sistema imunológico e de tecidos intestinais, carência em funções vasculares, nutricionais e endócrinas, e são mais susceptíveis a infecções do que animais normais ou previamente colonizados (Mazmanian, Round e Kasper, 2008). Espécies da microbiota expressam uma série de produtos, ou mesmo secretam metabólitos no microambiente, que contribuem para a manutenção da barreira intestinal e tolerância imunológica, como por exemplo o polissacarídeo A (PSA) presente na cápsula de *B.*

fragilis. Animais *germ-free* colonizados com *B. fragilis* expressando PSA, apresentam uma proteção contra a indução da colite experimental e outras patologias inflamatórias intestinais, assim como animais tratados com PSA purificado (Mazmanian, Round e Kasper, 2008).

Diversos são os trabalhos que mostram a contribuição desta espécie para a manutenção da tolerância intestinal - a primeira evidência de que moléculas de bactérias simbióticas medeiam respostas anti-inflamatórias essenciais para o hospedeiro vieram de estudos com *B. fragilis* (Mazmanian *et al.*, 2005). Como supracitado, *B. fragilis* expressando PSA protege animais contra a indução de colite experimental, através do requerimento de células TCD4⁺ produtoras de IL-10 e a supressão da produção de IL-17 por células do intestino (Mazmanian, Round e Kasper, 2008). Além disso, a monocolonização de animais *germ-free* com *B. fragilis* induz o desenvolvimento de células T reguladoras Foxp3⁺ produtoras de IL-10 no cólon e aumenta a capacidade supressiva das mesmas através da sinalização intrínseca via TLR2 (Round *et al.*, 2011; Round e Mazmanian, 2010).

Um importante produto metabolizado pela microbiota são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são produzidos pela fermentação de polissacarídeos não digeríveis provenientes da dieta. Esses AGCC possuem efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores, anti tumorigênicos e antimicrobianos (Tan *et al.*, 2014). Bactérias presentes na microbiota também são responsáveis por estimular determinadas células, como as células de Panneth, a produzirem peptídeos antimicrobianos que irão prevenir a colonização por patógenos (Hooper *et al.*, 2003).

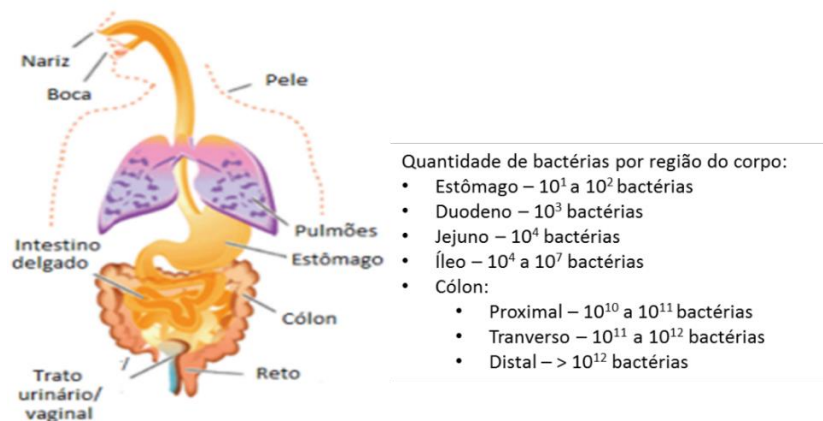


Figura 1. Regiões do corpo humano colonizadas por bactérias e quantidade de bactérias em diferentes sítios do TGI. Adaptado de Vyas e Ranganathan, 2012.

1.3. Gênero *Bacteroides*

Como dito no tópico anterior, o organismo é colonizado por uma grande quantidade de microrganismos, sendo que a maior parte dessas bactérias está localizada no cólon, onde a maioria é de anaeróbios e cerca de 25% pertencem ao gênero *Bacteroides*, membros do filo Bacteroidetes. Esse gênero é um dos simbiontes mais predominantes no cólon, sendo constituído por cerca de 20 espécies distintas (Wexler, 2007) sendo em torno de 8 presentes nesse sítio.

As bactérias que compõem esse gênero possuem forma bacilar, são Gram negativas, anaeróbios estritos, bile resistentes, não esporuladoras, produzem cápsula e fazem parte da microbiota humana (Willis, 1991). Como mencionado, elas vivem de forma comensal quando contidas dentro do intestino, desempenhando papéis importantes para a fisiologia do hospedeiro como, por exemplo, a tolerância intestinal. Por outro lado, essas bactérias possuem potencial patogênico quando escapam para sítios estéreis do corpo, causando infecções extra-intestinais como peritonite (Lobo *et al.*, 2013). Dentre as espécies desse gênero mais comumente isoladas em casos clínicos, pode-se destacar *B. fragilis* (Wexler, 2007).

1.4. Espécie *Bacteroides fragilis* e a fisiopatologia dos abscessos

No grupo de bactérias pertencentes ao gênero *Bacteroides*, a espécie *B. fragilis* tem a maior importância dentro da clínica por ser uma das bactérias anaeróbias mais comumente isoladas em casos de processos infecciosos extraintestinais de origem endógena, embora represente menos de 1% do gênero *Bacteroides* presente na microbiota do cólon (Giamarellou, 2000).

Quando há uma ruptura das barreiras intestinais e conseqüente extravasamento do conteúdo intestinal, *B. fragilis* escapa para a cavidade peritoneal e pode vir a estabelecer uma infecção. A bactéria precisa, portanto, expressar diversos fatores de virulência para conseguir aderir, colonizar e se multiplicar. Aliando esses mecanismos e a resposta do hospedeiro contra essa infecção, normalmente ocorre a formação de abscessos, que é uma das principais respostas do organismo à infecção por *B. fragilis* (Gibson *et al.*, 1998; Troy *et al.*, 2010).

Fatores de virulência de *B. fragilis* como a capacidade de expressar um complexo polissacarídico capsular (CPC), aderência microbiana, produção de proteases, neuraminidases ou enterotoxina em algumas cepas, expressão de LPS, inibição da fagocitose, aquisição de ferro e a resistência ao estresse oxidativo desempenham um papel importante durante a patogenicidade dessa bactéria (Smith *et al.* 2006). Quando *B. fragilis* alcança sítios estéreis extra intestinais,

primeiramente ela se fixa através de fímbrias, pili e/ou adesinas. Essa adesão permite estabelecer uma infecção no organismo e também permite a evasão do sistema imune (Finlay e Falkow, 1997; Pauer *et al.*, 2013). Além desses, outro fator de virulência se destaca como um dos mais importantes, o CPC (Kalka-Moll *et al.*, 2001).

Componentes do CPC, principalmente o PSA (**Figura 2**), embora contribuam para a tolerância imunológica intestinal durante a simbiose, também participam do estabelecimento da peritonite, permitindo a ligação da bactéria ao epitélio e levando à ativação de mecanismos do sistema imunológico, que fomentam o desenvolvimento de abscessos. Esse complexo é constituído estruturalmente por oito PSs diferentes, nomeados de PSA a PSH (Krinos *et al.*, 2001). Uma característica relevante dos polissacarídeos que compõem a capsula bacteriana de *B. fragilis* é que eles têm propriedade *zwitterionica*, ou seja, há uma alternância de cargas negativas e positivas em sua estrutura (Wexler, 2007). A cápsula também tem papel importante na proteção da bactéria contra a fagocitose por células do sistema imune, como PMNs e macrófagos, resultando em evasão do sistema imune do hospedeiro (Pumbwe, Skilbeck e Wexler, 2006; Duan, Avci e Kasper, 2008).

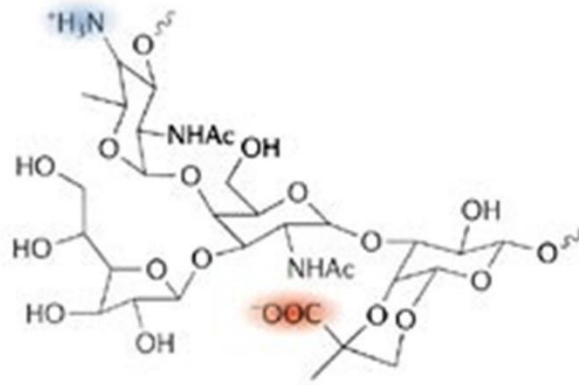


Figura 2. Estrutura do PSA de *B. fragilis*. Adaptado de Mazmanian e Kasper, 2006.

Outro fator de virulência de *B. fragilis* é a presença de lipopolissacarídeo (LPS) (**Figura 3**), que é um glicolípido que está presente majoritariamente na porção externa da membrana de bactérias Gram negativas e desempenha um papel importante na patogênese de muitos microrganismos (Whitfield e Trent, 2014). No entanto, *B. fragilis* expressa um LPS atípico, sendo até mil vezes menos tóxico do que o LPS expresso por *E. coli*, por exemplo.

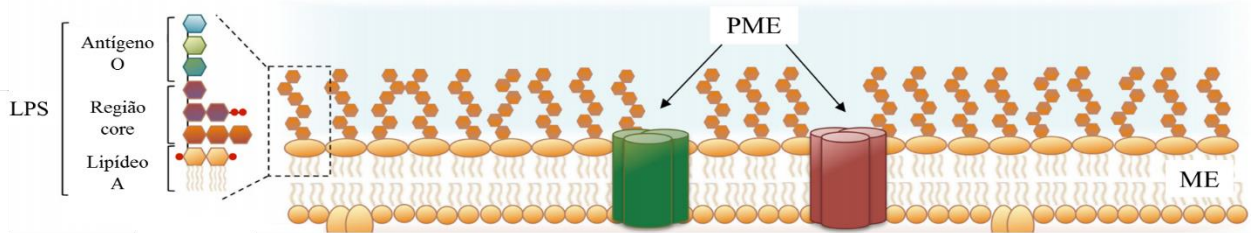


Figura 3. Membrana externa de uma bactéria Gram negativa e representação da estrutura do LPS. Adaptado de Maldonado *et al.*, 2016. ME – Membrana externa; PME – Proteínas de membrana externa

Algumas cepas de *B. fragilis*, além de possuírem cápsula e LPS em sua membrana, têm a capacidade de produzir uma enterotoxina conhecida como BFT, uma metaloprotease dependente de zinco (Sears *et al.*, 2014). Artigos da literatura demonstraram em experimentos *in vitro* que essa toxina aumenta a permeabilidade da barreira de células epiteliais do cólon, levando a episódios de diarreia, bem como à inflamação do cólon e à carcinogênese (Obiso *et al.*, 1995; Chambers *et al.*, 1997; Rabizadeh *et al.*, 2007; Rhee *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2012). Esse aumento da permeabilidade está correlacionado com a capacidade da BFT de clivar a proteína de adesão célula-célula, E-caderina, via um receptor ainda não descrito (Wu *et al.*, 1998, 2007).

Outra característica de *B. fragilis* importante para a sua virulência e resistência em meios extra intestinais é a aerotolerância, já que entre as bactérias anaeróbias, o *B. fragilis* é uma das espécies que mais resiste ao oxigênio, podendo sobreviver cerca de 3 dias na presença de níveis atmosféricos do gás. Esse fator se demonstra importante durante o curso da infecção peritoneal causada por essa bactéria, visto que a mesma sai de um ambiente mais reduzido, como o cólon, e passa a habitar ambientes mais oxidados como a cavidade peritoneal (Ndamukong *et al.*, 2013).

Vários modelos experimentais de desenvolvimento de abscessos induzido por *B. fragilis* vêm sendo utilizados por diferentes grupos, embora o adotado neste projeto seja o modelo de peritonite monomicrobiana mais amplamente abordado e melhor descrito na literatura. Esse modelo consiste no inóculo intraperitoneal (ip.) de *B. fragilis* em combinação com um agente potencializador que possua propriedades adjuvantes, como o conteúdo cecal estéril (CCE), o que provoca uma forte resposta inflamatória e contribui para o desenvolvimento de abscessos (Nulsen *et al.*, 1983; Gibson, Tzianabos e Onderdonk, 1996; Finlay-Jones *et al.*, 1999). A utilização do CCE mimetiza a situação em que há o extravasamento do conteúdo intestinal, principalmente do cólon, levando para esta cavidade produtos da microbiota e da dieta (Finlay-Jones *et al.*, 1991).

Abscessos são compostos por células mortas, tanto de microrganismos como do tecido original, neutrófilos e macrófagos confinados em uma rede de fibrina (Garcia-Sanchez *et al.*, 2013).

O seu desenvolvimento ocorre a partir de uma resposta inicialmente benéfica do hospedeiro, pois auxilia a localizar e conter a bactéria, prevenindo o desenvolvimento da sepse (Rodrigues *et al.*, 2005). *B. fragilis* encapsulado, ao causar um processo infeccioso, se liga ao mesotélio e passa a ser mais resistente aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro. Células mesoteliais e macrófagos residentes do peritônio respondem à infecção através da produção de diversas citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , e quimiocinas, como IL-8, levando ao recrutamento e acúmulo de mais células no local da infecção, como neutrófilos e monócitos (Gibson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006; Alhawi *et al.*, 2009). Além de células da imunidade inata, linfócitos T também são importantes para a resposta que leva ao desenvolvimento de abscessos intra-abdominais (Shapiro *et al.*, 1986). Quando há ativação de linfócitos T pelo PSA através de APCs, estes produzem citocinas como IL-17, IFN- γ e TNF- α , além de produzirem também quimiocinas responsáveis pelo recrutamento celular, como neutrófilos, contribuindo para a formação de abscessos (Wang *et al.*, 2006; Surana e Kasper, 2012). Trabalhos na literatura mostram que tanto células Th1 como Th17 participam da fisiopatologia da formação de abscessos.

Além de estimular a produção de citocinas e quimiocinas, a ligação do *B. fragilis* ao mesotélio, também estimula o mesotélio a expressar moléculas de adesão, como ICAM-1, que irão contribuir para a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Gibson *et al.*, 1998). Esse recrutamento de células, especialmente de neutrófilos e sua consequente adesão ao mesotélio, são os primeiros passos para a formação de abscessos intra-abdominais (Tzianabos e Kasper, 2002) **(Figura 4)**.

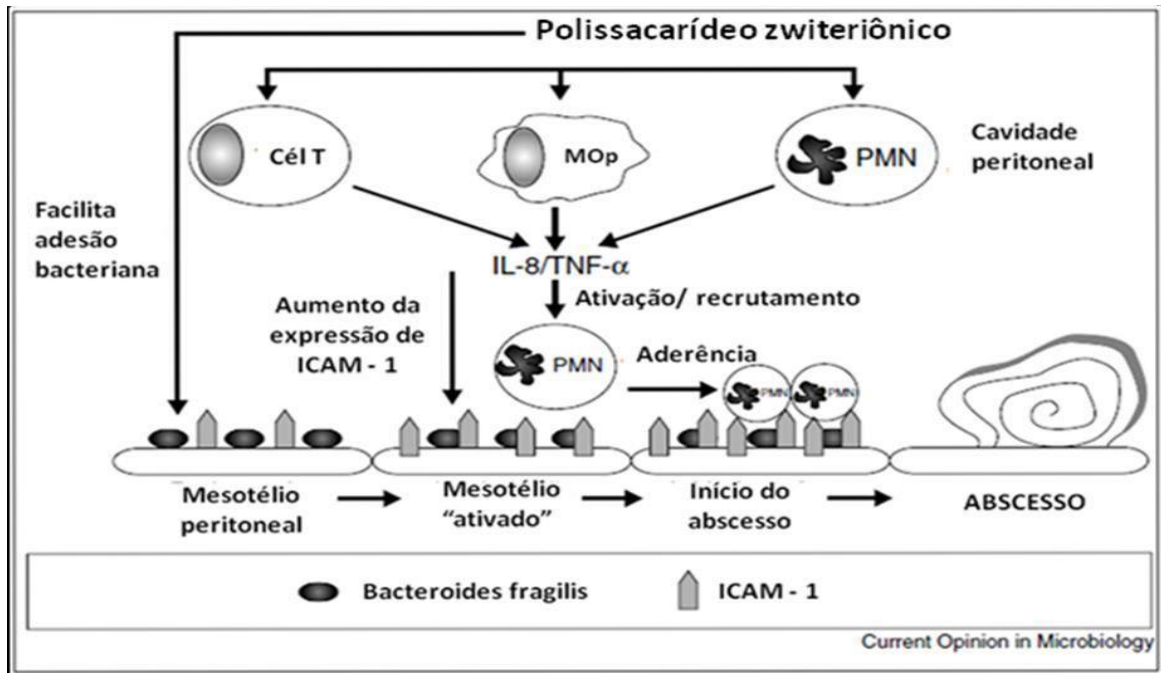


Figura 4. Modelo de formação de abscessos intra-abdominais induzido por *B. fragilis*. Adaptado de Tzianabos e Kasper, 2002.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias produzidas no local da infecção que contribuem para o desenvolvimento da peritonite, destaca-se a IL-1 β . Esta citocina tem efeitos locais e sistêmicos em várias células e tecidos, como ativação do endotélio e aumento da permeabilidade vascular, auxiliando no recrutamento de células para o sítio da infecção (Garlanda, Dinarello e Mantovani, 2013). Nos últimos anos, nosso grupo vem se dedicando a estudar a participação deste mediador inflamatório no modelo de peritonite induzida por *B. fragilis*, que, devido a sua importância para este projeto, será abordado mais extensamente no próximo tópico.

1.5. IL-1 β e inflamossomos

A IL-1 β é produzida por diversos tipos celulares e já foi descrita como tendo várias funções no organismo. Essa citocina é produzida em resposta a infecções e danos teciduais estéreis, sendo a principal causadora de inflamações agudas e crônicas (Dinarello, 1998). Quando é secretada em baixas concentrações, atua localmente recrutando células para o local da infecção. A IL-1 β , assim como o TNF- α , é secretada por macrófagos quando estimulados por indutores de resposta inflamatória, e leva a ativação de células endoteliais das vênulas que modulam a expressão de ligantes para integrinas e quimiocinas. Essas integrinas irão mediar a adesão de neutrófilos, enquanto as quimiocinas ativam e estimulam a migração dessas células para o foco inflamatório.

Além de neutrófilos, monócitos e linfócitos T ativados usam esses mesmo mecanismos para migrar para os locais da inflamação (Mesquita Júnior *et al.*, 2008).

Quando secretada em grandes quantidades, a IL-1 β ganha a corrente sanguínea e atua sistemicamente, alterando a regulação da temperatura corporal, causando febre. Além disso, essa citocina serve como mediador de diversos efeitos durante a inflamação, como hipotensão e liberação de adrenocorticotróficos (Johnston, Rahman e Mcfadden, 2007).

Geralmente, as proteínas que são produzidas no citoplasma e posteriormente secretadas pelas células possuem uma sequência de aminoácidos que funcionam como sinal de endereçamento que as conduzem a determinadas estruturas celulares, como o retículo endoplasmático (RE). A partir do lúmen do RE, essas proteínas são direcionadas ao complexo de Golgi. Posteriormente, as proteínas presentes no Golgi são armazenadas em vesículas que vão até a membrana celular e lá se fundem com a mesma, liberando as proteínas para o meio extracelular. Essa é a via clássica de secreção de proteínas (Alberts *et al.*, 2010). Já as proteínas membros da família da IL-1 não possuem a sinalização desses peptídeos, de forma que não são exportadas para o meio extracelular pela via clássica. Algumas interleucinas dessa família possuem resíduos de aminoácidos na porção N-terminal, como por exemplo, a IL-1 β e a IL-18, e através dessa porção são reconhecidas por enzimas proteolíticas que irão proceder com sua clivagem para sua consequente liberação da célula. Na pró-IL-1 β e na pro-IL-18, esses resíduos de aminoácidos são clivados pela enzima caspase-1, gerando a citocina madura que é então secretada pela célula (Smith, 2011). Sendo assim, o processamento da IL-1 β e da IL-18 é muito bem regulado a níveis pós transcricionais. Para que haja ativação de caspase-1 e processamento das formas imaturas destas citocinas, há a necessidade da ativação dos inflamossomos, que são complexos multiproteicos citoplasmáticos que sustentam a ativação desta caspase inflamatória (Martinon, Burns e Tschopp, 2002; Schroder e Tschopp, 2010; Davis, Wen e Ting, 2011).

Os inflamossomos são formados através da oligomerização de seus componentes no citoplasma, após estímulo por padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), padrões moleculares associados a dano (DAMPs), como adenosina trifosfato (ATP), ou ainda substâncias exógenas, como alum ou sílica. Esses complexos são geralmente formados por três subunidades: um receptor, que comumente pertence a família NLR, uma proteína adaptadora ASC, cujo requerimento depende do inflamossomo em questão, e a enzima inativa pro-caspase-1. Quando há a oligomerização desse complexo, acontece uma auto clivagem da pro-caspase-1, que

a torna ativa e capaz de realizar a clivagem proteolítica das formas imaturas pró-IL-1 β e pró-IL-18, gerando as citocinas maduras IL-1 β e IL-18, que são então secretadas da célula (Martinon, Burns e Tschopp, 2002).

Sendo assim, a secreção da IL-1 β , assim como da IL-18, requer duas etapas de ativação celular. Inicialmente há a necessidade de um *priming* ou primeiro sinal na célula, que vai levar a ativação de NF- κ B, levando à transcrição de genes como o da pro-IL-1 β . Essa sinalização acontece via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), principalmente via *Toll like receptors* (TLRs), porém também pode acontecer via receptores de citocinas, como TNFR e IL-1R (Schroder e Tschopp, 2010). Estudos *in vitro* mostram a dependência desse *priming* para a ativação do NF- κ B, e muitos trabalhos utilizam o LPS, que é um ligante de TLR4, como indutor desse primeiro sinal (Park *et al.*, 2015).

Já o segundo sinal para ativação celular leva à oligomerização do inflamossomo que, por sua vez, irá levar a ativação da caspase-1 e clivagem das formas imaturas das citocinas em suas formas maduras (Schroder e Tschopp, 2010). Essa oligomerização se dá pela interação de domínios semelhantes entre as proteínas, formando uma estrutura multiproteica que irá servir como plataforma para a ação enzimática da caspase-1. Receptores como o NLRP1, NLRP3 e o NLRC4 começam a se oligomerizar através da interação entre domínios NACHT-NACHT e recrutam a pró-caspase-1 através de ligações CARD-CARD (como para NLRC4), ou via a proteína adaptadora ASC, que fará ligações com o receptor através do domínio PYD, como no caso do inflamossomo NLRP3 (Von Moltke *et al.*, 2013) (**Figura 5**). Esse segundo sinal que vai levar à oligomerização dos inflamossomos pode ser proveniente de diversos estímulos, como a flagelina, que é um ativador conhecido de NLRC4 (Franchi *et al.*, 2006) e a toxina letal de *Bacillus anthracis*, que é ativador de NLRP1 (Boyden e Dietrich, 2006). Já os ativadores de NLRP3 serão discutidos mais extensamente ao longo do texto, devido a sua importância para o trabalho.

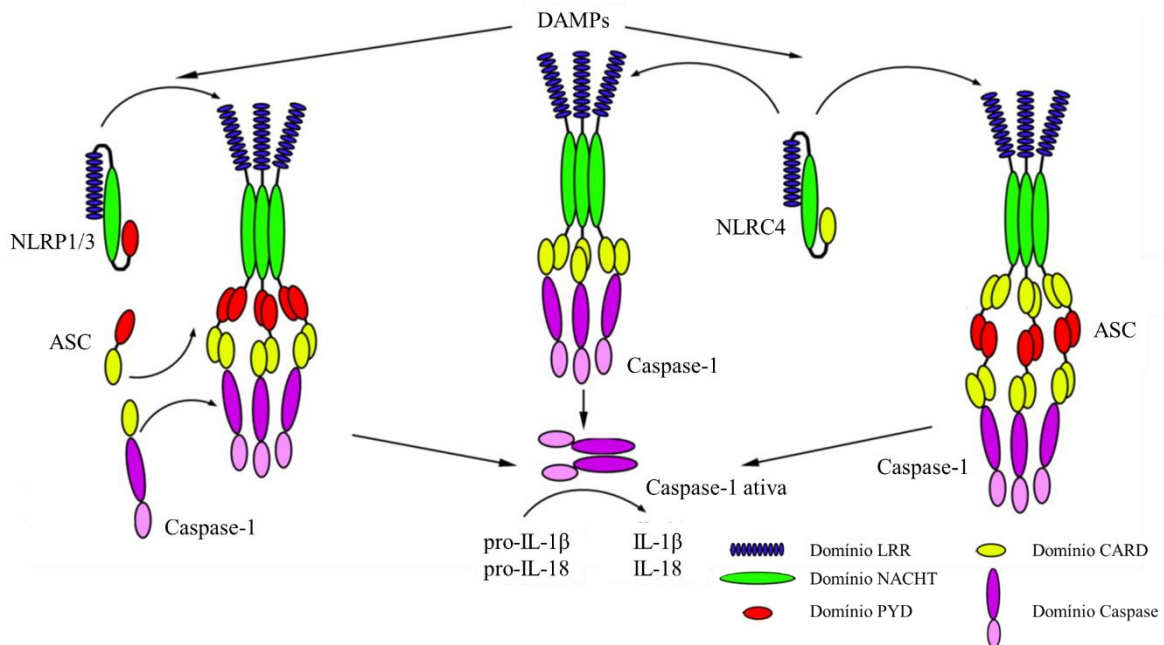


Figura 5. Interações proteicas nos inflamossomos. Adaptado de Stehlik e Dorfleutner, 2007.

A primeira caspase a ser descoberta foi a caspase-1, mas os mecanismos que levam à sua ativação só foram descritos recentemente. Quando há a ativação do inflamossomo e consequente ativação de caspases inflamatórias, além da secreção de IL-1β, pode ocorrer também um processo de morte celular, conhecido como piroptose. A piroptose, que é a morte da célula associada ao processo inflamatório, pode ser dependente de caspase-1 ou caspase-11, e se caracteriza pela formação de poros na membrana e consequente liberação do conteúdo citoplasmático (Riteau, Gombault e Couillin, 2016).

Resultados ainda não publicados do nosso grupo (Castelpoggi, J.P., tese de doutorado, IBCCF, 2016 – manuscrito em preparação) mostraram que, utilizando o modelo de peritonite induzido pela combinação de *B. fragilis* e CCE, a sinalização via receptor de IL-1 é essencial ao desenvolvimento de peritonite, já que animais IL-1R^{-/-} apresentam perda de peso atenuada e menor *score* de abscessos, quando comparados a animais selvagens (**Figura 6**). Apesar disso, quando analisados até 120 dias após a infecção, estes animais se comportaram de forma semelhante a camundongos selvagens, não apresentando disseminação sistêmica da bactéria, mortalidade ou qualquer parâmetro de evolução da doença (Castelpoggi, J.P., tese de doutorado, IBCCF, 2016). Isto sugere que a redução no desenvolvimento de abscessos na ausência da sinalização pelo receptor IL-1R não impacta na resistência e no controle da infecção pelo hospedeiro.

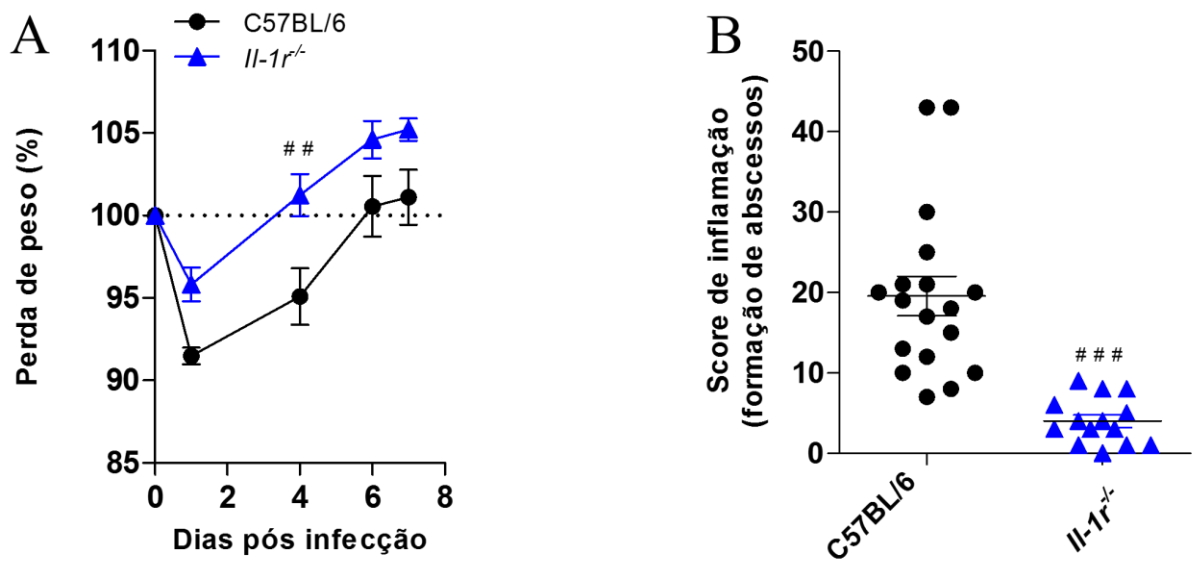


Figura 6. Ausência de IL-1R protege os camundongos da peritonite induzida por *B. fragilis* e CCE. Camundongos C57BL/6 e Il-1r^{-/-} foram inoculados i.p. com *B. fragilis* na presença de CCE (v/v). Em (A) o monitoramento do peso corporal foi realizado ao longo de 7 dias. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de pelo menos 5 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. # #p<0,01 em comparação com camundongos WT. (B) *Score* de abscesso foi determinado no dia 7 após a infecção utilizando o número e tamanho de abscesso como parâmetros. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. Cada símbolo representa um animal. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. # # #p<0,001 em comparação com camundongos WT.

Além de mostrar que a sinalização via citocina IL-1 β é importante para o desenvolvimento de peritonite, também foi demonstrado que o CCE, mas não *B. fragilis*, é capaz de induzir a secreção de IL-1 β *in vivo* no lavado peritoneal (**Figura 7**) e em cultura de macrófagos e células dendríticas *in vitro* (**Figuras 8 e 9**).

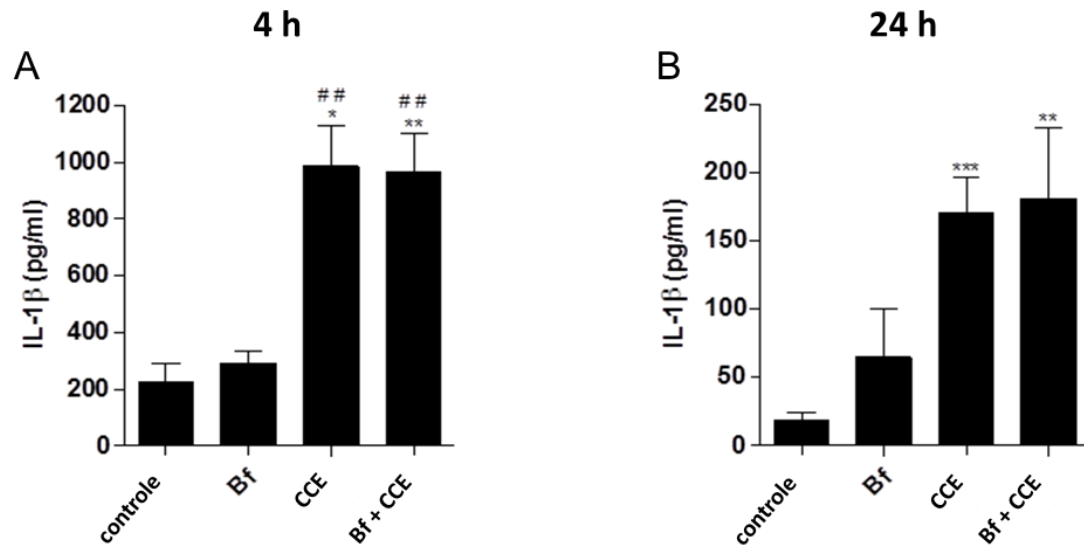


Figura 7. CCE, mas não *B. fragilis*, induz *in vivo* a secreção de IL-1 β . Camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p com PBS (200 μ L), *B. fragilis* (1×10^8 UFC), CCE (100 μ L) ou a combinação de *B. fragilis* com CCE (v/v). Após 4 h (A) ou 24 h (B), o lavado peritoneal foi obtido para quantificação de IL-1 β por ELISA. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes; os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos 4 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando teste t-Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em comparação com *B. fragilis* sozinho.

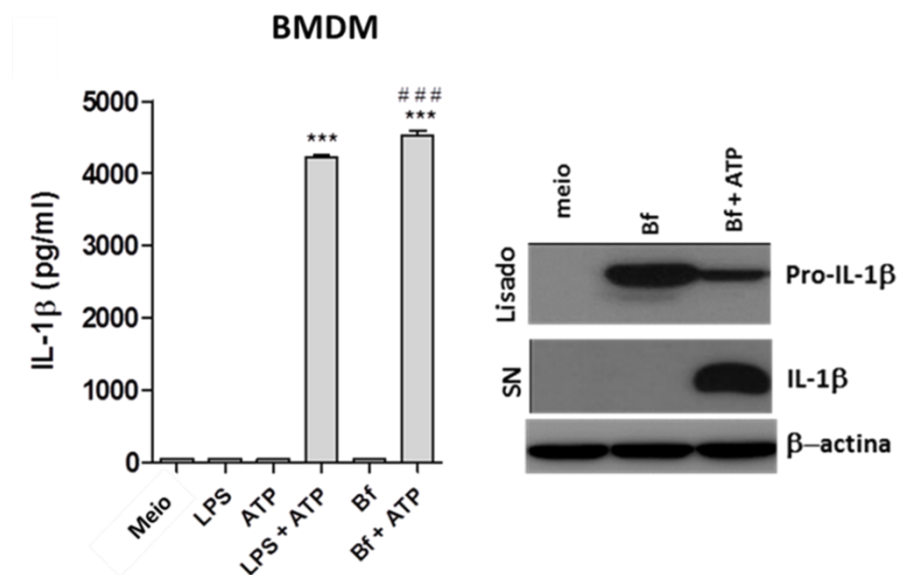


Figura 8. CCE, mas não *B. fragilis*, induz a secreção de IL-1 β *in vitro* por macrófagos. Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) obtidos a partir de camundongos C57BL/6 foram estimulados com LPS (500 ng/mL) ou com *B. fragilis* (MOI: 50) durante 6 horas a 37°C. Nos últimos 30 min de incubação, ATP (5 mM) foi adicionado quando indicado, e os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β por ELISA. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes; os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. *** $p < 0,001$ quando comparado com o meio; ### $p < 0,001$ em comparação com *B. fragilis* sozinho. Em paralelo, foi realizada a análise por *Western blotting* da pró-IL1 β (p35) em lisados celulares e a forma bioativa (p17) de IL-1 β no sobrenadantes (SN) de macrófagos estimulados.

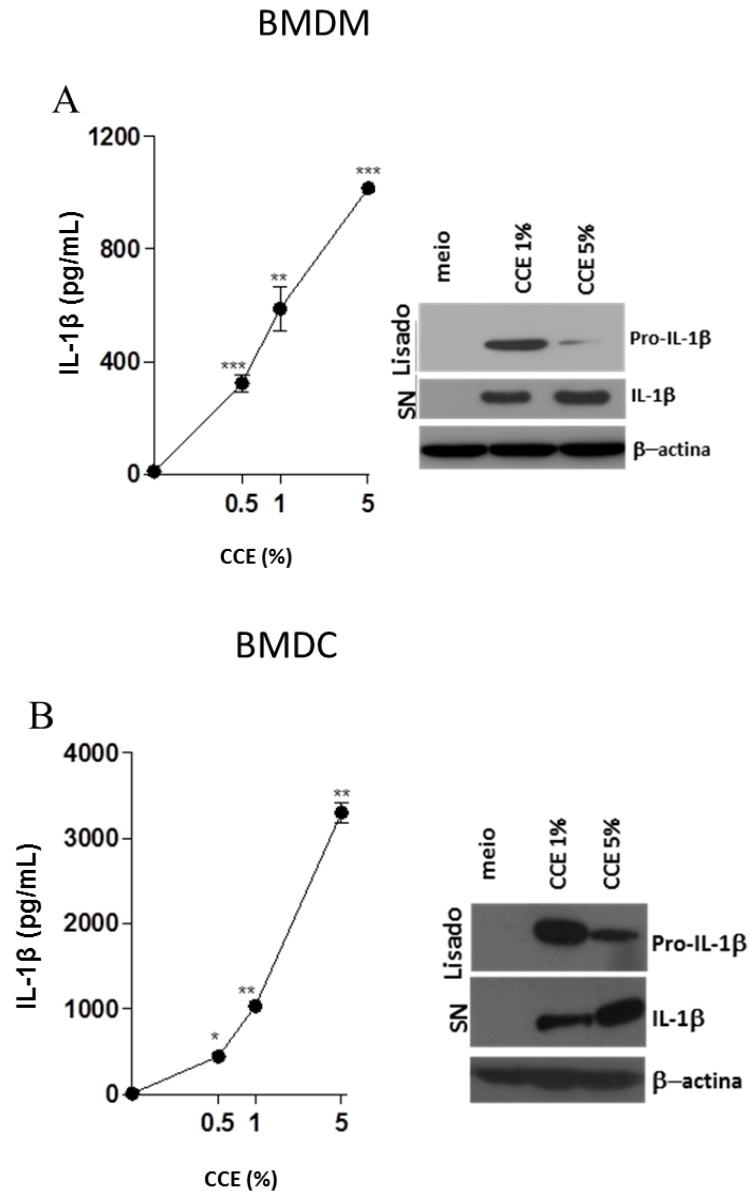


Figura 9. CCE induz a secreção de IL-1 β por macrófagos e células dendríticas *in vitro* de maneira dose dependente. (A) Macrófagos (BMDM) e (B) células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) obtidos a partir de camundongos C57BL/6 foram estimulados com CCE (% v/v) durante 6 horas a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β por ELISA (**painéis à esquerda**). Os dados são representativos de 4 experimentos independentes; os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o meio. Em paralelo, foi realizada a análise por Western blotting da pró-IL 1 β (p35) em lisados celulares e a forma bioativa (p17) de IL-1 β no sobrenadantes (SN) de células estimuladas (**painéis à direita**).

Apesar de termos caracterizado que o CCE é o responsável pela secreção de IL-1 β neste modelo, a participação de inflamossomos e, principalmente, qual inflamossomo está envolvido bem como seu mecanismo de ativação são questões que permanecem em aberto. De todos os

inflamossomos já descritos, o melhor estudado até o momento é o NLRP3, que devido à importância para este estudo será mais amplamente abordado a seguir.

1.6. Inflamossomo NLRP3

O inflamossomo NLRP3, composto pelo receptor NLRP3, pela proteína adaptadora ASC e pela pro-caspase-1, é o mais bem estudado e com a maior variedade de ativadores já descritos. Dentre os ativadores de NLRP3 já descritos na literatura, tem-se MAMPs como toxinas bacterianas, DAMPs como ATP, ácido hialurônico, proteína β amiloide, níveis elevados de glicose, cristais de colesterol e de ácido úrico, bem como produtos do ambiente, como sílica e asbestos (Kono e Rock, 2008; Schroder e Tschopp, 2010; Franchi, Munoz-Planillo e Nunez, 2012; Henao-Mejia *et al.*, 2012). Além destes, um adjuvante muito comum usado em vacinas, o hidróxido de alumínio (ou alum), também já se mostrou capaz de ativar NLRP3, embora não se saiba muito sobre a importância dessa via para a sua propriedade adjuvante (Li, Nookala e Re, 2007; Eisenbarth *et al.*, 2008; Franchi e Nunez, 2008; Kool *et al.*, 2008) (**Figura 10**).

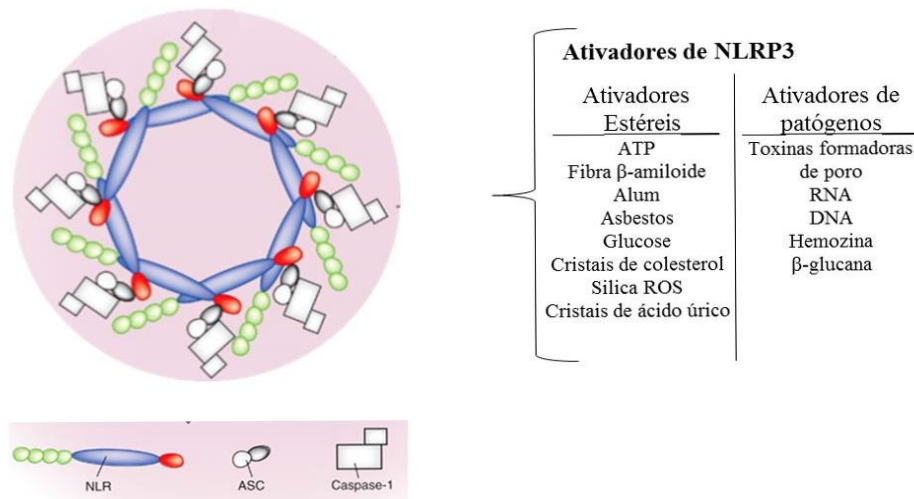


Figura 10. Ativadores de NLRP3. Adaptado de Elinav, Henao-Mejia e Flavell, 2012.

Embora se tenha esta vasta lista de ativadores de NLRP3, ainda não estão bem descritos quais os mecanismos moleculares que levam a essa ativação. Existem discussões no meio científico acerca de modelos não excludentes já propostos que levam a ativação do inflamossomo NLRP3, embora todos assumam que nenhum ativador já descrito interaja diretamente com o receptor em questão.

Na literatura encontramos alguns mecanismos distintos propostos para a ativação de NLRP3 (**Figura 11**), dos quais os principais são:

1. Indução de efluxo celular de potássio através da abertura de poros na membrana.

Altas concentrações de ATP extracelular, sinalizando via o receptor purinérgico P2X₇, ou toxinas bacterianas, levam à formação de poros na membrana plasmática da célula. Por esses poros há o efluxo de K⁺, que desencadeia a despolarização da membrana e aumento do volume celular, e isso pode levar a oligomerização do inflamossomo e consequente produção de IL-1 β (Petrilli *et al.*, 2007). Essa é uma via comum desencadeada por diversos ativadores já descritos, caracterizando ser um mecanismo importante para a ativação do inflamossomo NLRP3 (Muñoz-Planillo *et al.*, 2013).

2. Indução de ROS. Já é sabido que a mitocôndria é uma das responsáveis pela produção de ROS nas células (Handy e Loscalzo, 2012) e alguns estudos mostraram que o ROS mitocondrial, principalmente, leva a ativação do inflamossomo NLRP3 (Heid *et al.*, 2013). Por outro lado, há observações na literatura que mostram que quando há liberação de DNA proveniente de dano mitocondrial, esse mDNA também é capaz de ativar o inflamossomo (Shimada *et al.*, 2012). Mesmo com todos os estudos apontando a importância do ROS mitocondrial na ativação de NLRP3, existem outros estímulos que levam a produção de ROS independente de mitocôndria e que este também pode levar a ativação deste inflamossomo, mostrando que ainda há a necessidade de esclarecer como o ROS regula a ativação de NLRP3 (Jo *et al.*, 2016).

3. Desestabilização lisossomal e liberação de catepsinas no citoplasma celular.

Substâncias particuladas exógenas, como sílica ou alum, ou endógenas, como cristais de ácido úrico e de colesterol, são fagocitadas pelas células, especialmente macrófagos. Já dentro da célula, há a fusão entre o fagossomo e o lisossomo, formando o fagolisossomo. Tais substâncias particuladas, presentes no interior desse fagolisossomo, causam desestabilização da membrana do mesmo, levando a sua ruptura e liberação de catepsinas lisossomais, que antes estavam compartimentalizadas, para o citoplasma, em um processo chamado “fagocitose frustrada”. Dentre essas, a catepsina B, uma protease que pode levar a ativação do inflamossomo NLRP3 (Schroder e Tschopp, 2010).

Como falado anteriormente, esses três mecanismos são os principais já propostos que levam à ativação do inflamossomo NLRP3, embora existam outros como o influxo celular de cálcio, TXNIP e a sinalização do ADP via seu receptor. No que diz respeito ao influxo de cálcio, Yaron e

colaboradores demonstraram que células primadas com LPS e estimuladas com ATP sinalizando via o seu receptor P2X₇ tem o efluxo de potássio induzido e isso resulta em um influxo de cálcio. Tal influxo de cálcio leva à geração de ROS pela mitocôndria da célula, resultando na ativação do inflamossomo e produção de IL-1 β (Yaron *et al.*, 2015).

Quanto ao papel da *thioredoxin interacting protein* (TXNIP), Zhou e colaboradores mostraram que essa proteína é capaz de se ligar de forma específica ao NLRP3, uma vez que esta proteína não se liga a nenhum outro membro da família NLR ou a proteínas que contenham LRRs. Além disso, esse grupo demonstrou que a TXNIP, presente em células em repouso, estão ligadas a TRX, não estando disponível para a ligação com NLRP3. Após estímulo que leve o aumento da produção de ROS na célula, TXNIP é separada da TRX oxidada, ficando assim disponível para se ligar a NLRP3. Outros resultados demonstraram que macrófagos deficientes em TXNIP, quando estimulados com conhecidos ativadores do inflamossomo NLRP3, não apresentam produção de IL-1 β . Esses resultando então, mostram a importância dessa proteína para a ativação de NLRP3 (Zhou *et al.*, 2010).

E o último mecanismo citado é a sinalização do ADP via receptor P2YR. Células autofágicas liberam ATP no meio extracelular, a sinalização do ATP via seu receptor P2X₇, em conjunto com o efluxo de potássio, são mecanismos requeridos para a ativação de NLRP3. A partir do momento em que estas células liberam o ATP para o meio extracelular, este ATP pode ser degradado a ADP, AMP ou adenosina. Esses metabólitos de ATP podem sinalizar através de outros receptores purinérgicos e, em particular, ATP via P2X₇ e ADP via P2Y. Sinalização purinérgica e efluxo de potássio resultam na oligomerização do inflamossomo, com ativação de caspase-1 e produção de citocinas como a IL-1 β (Gombault, Baron e Coullin, 2013).

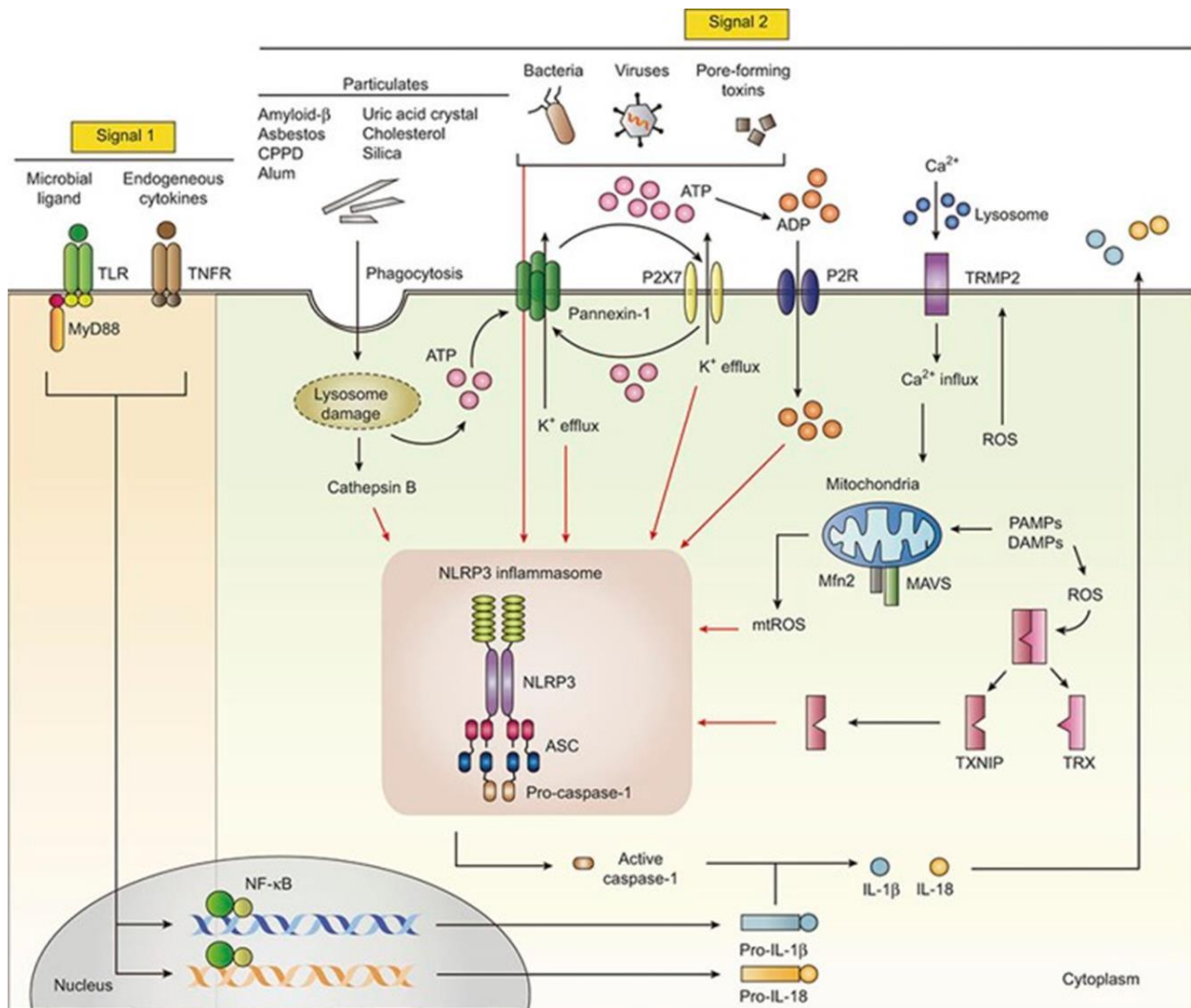


Figura 11. Principais hipóteses para a ativação do inflamossomo NLRP3. Adaptado de Jo *et al.*, 2016.

Em conjunto, todas as informações relacionadas aqui mostram que a IL-1 β é uma importante citocina envolvida em diversos processos inflamatórios. Visto que essa citocina requer a ativação do inflamossomo, o presente trabalho visa elucidar qual inflamossomo está envolvido na produção de IL-1 β induzida por CCE no nosso modelo, bem como desvendar os mecanismos de ativação desse inflamossomo.

2. JUSTIFICATIVA

Resultados prévios do nosso grupo ainda não publicados mostraram que, utilizando modelo murino de peritonite induzida por CCE e *B. fragilis*, a sinalização da citocina IL-1 β é essencial para a resposta inflamatória e consequente desenvolvimento de abscessos e manifestação da doença, embora não tenha se mostrado fundamental para o controle da infecção e resistência do hospedeiro. Esse modelo de indução da peritonite foi descrito em 1979 por Onderdonk e colaboradores e se tornou importante, pois mimetiza o quadro clínico da doença, porém quando associada a um único microrganismo. Sendo assim, nos permite estudar a importância da espécie *B. fragilis* e do CCE durante o curso da infecção, já que, neste modelo de peritonite monomicrobiana, damos destaque a uma das bactérias mais comumente isoladas em casos clínicos de peritonite. O CCE, por outro lado, ajuda a mimetizar o extravasamento do conteúdo intestinal, incluindo produtos da dieta, para a cavidade, levando ao desenvolvimento da peritonite em conjunto com a bactéria. Observamos também que o CCE, por si só, leva a produção de IL-1 β tanto em experimentos *in vivo*, onde avaliamos a produção desta citocina no lavado peritoneal de camundongos em diferentes tempos após a inoculação, como *in vitro*, em culturas de macrófagos e células dendríticas. Por outro lado, o *B. fragilis* isoladamente não apresentou este efeito, o que pode ser justificado pela sua natureza simbiote. Para que haja a produção de IL-1 β , são requeridos dois sinais: um *priming* que leva a produção da pro-IL-1, e um segundo sinal que leva a oligomerização e ativação de inflamossomos, que por sua vez levam a ativação de caspase-1, que irá clivar a pro-IL-1 em sua forma madura IL-1 β . O segundo sinal geralmente é fornecido por moléculas associadas a dano ou estresse celular, o que indicaria um sinal de perigo e a necessidade de produção de IL-1 β . Isto justificaria a incapacidade do *B. fragilis*, como componente da microbiota intestinal, de induzir a produção desta citocina.

Uma vez que a IL-1 β é produzida em resposta ao CCE e se mostrou essencial para o desenvolvimento de peritonite, e que a ativação de inflamossomos é um passo fundamental para a produção desta citocina, esse trabalho visou caracterizar o papel do inflamossomo NLRP3 na produção de IL-1 β induzida por CCE e sua participação no desenvolvimento de peritonite. Além disso, pretendemos desvendar o (s) mecanismo (s) ou via (s) que leve (em) a ativação desse inflamossomo no nosso modelo, procurando identificar o componente do CCE responsável por essa ativação. O inflamossomo composto pelo receptor NLRP3 é o melhor estudado e com maior

variedade de ativadores descritos até o momento, e por este motivo foi o inflamossomo de escolha para focarmos nesse projeto.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal desse projeto foi investigar a participação do inflamossomo NLRP3 na produção da citocina IL-1 β induzida por CCE e no desenvolvimento de peritonite induzida pela bactéria *Bacteroides fragilis* em combinação com CCE. Além disso, pretendemos avaliar o mecanismo de ativação do inflamossomo neste modelo, buscando identificar a (s) molécula (s) responsável (is) por essa ativação.

Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar o papel do receptor NLRP3 *in vitro* na produção de IL-1 β induzida por CCE em culturas de macrófagos e células dendríticas murinas;
2. Investigar a participação de NLRP3 *in vivo* no desenvolvimento de peritonite experimental induzida por *B. fragilis* e CCE;
3. Sendo o ATP um dos principais ativadores de NLRP3, avaliar o papel do receptor purinérgico P2X₇ na secreção de IL-1 β induzida por CCE *in vitro* e na peritonite induzida por *B. fragilis* + CCE *in vivo*;
4. Esclarecer o (s) mecanismo (s) de ativação do inflamossomo NLRP3 por CCE através da utilização de diversos inibidores;
5. Uma vez estabelecido o mecanismo que leva a ativação do inflamossomo, estudar a participação da fibra particulada proveniente da dieta na produção de IL-1 β por CCE *in vitro*;
6. Avaliar a importância da fibra da dieta no desenvolvimento da peritonite *in vivo*;
7. Em paralelo à produção de IL-1 β , avaliar a capacidade do CCE de induzir piroptose em macrófagos *in vitro*, através da liberação de lactato desidrogenase (LDH), procurando estabelecer a via e o mecanismo desta resposta;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cepa bacteriana e condições de cultivo

A cepa bacteriana de *B. fragilis* utilizada foi a 638R (Privitera, Sebaldo e Fayolle, 1979). Esta cepa é um isolado clínico e foi gentilmente cedida pelo Dr. Edson Ribeiro Rocha, *East Carolina University Brody School of Medicine*, Greenville, NC, EUA, através da colaboração com o Laboratório de Biologia de Anaeróbios (IMPG, UFRJ). A cepa foi reativada em caldo *Brain Heart Infusion* pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente (PRAS), suplementado com menadiona (10 µg/mL – Sigma) e hemina (0,5 mg/mL – Sigma) sob fluxo de CO₂, e incubado em estufa a 37°C por 18 h (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). Com o auxílio da alça bacteriológica de platina, o cultivo foi semeado em meio de Ágar Sangue Suplementado (ASS) com menadiona (10 µg/mL) e hemina (0,5 mg/mL) e também em meio *Bacteroides* Bile Esculina (BBE), com o objetivo de verificar a pureza da cepa. A incubação foi realizada em câmara de anaerobiose como previamente descrito (Jousimies-Somer *et al.*, 2002) na presença de rifampicina (20 µg/mL), já que a cepa apresenta resistência intrínseca a essa droga. Para a infecção com *B. fragilis*, uma multiplicidade de infecção (MOI) de 50 foi utilizada para todos os experimentos, como descrito nas legendas das figuras.

4.2. Animais

Foram utilizados camundongos machos de aproximadamente 8 semanas, mantidos em microisoladores estéreis, com livre acesso a água e ração, com ciclo diurno e noturno de 12 horas, temperatura e umidade controladas provenientes do Laboratório de animais transgênicos (LAB-ORIO). Foram utilizadas as linhagens C57BL/6 (WT) e camundongos deficientes em NLRP3, ASC ou caspase-1/11, cedidos pelo Dr. Dario Zamboni (FMRP, SP), e deficientes na caspase-11 ou no receptor purinérgico P2X₇, cedidos pelo Dr. Robson Coutinho (IBCCF^o, UFRJ). Todos os experimentos seguiram as orientações do Comitê de Ética Institucional e este projeto foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética no uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob inscrição IBCCF 132.

4.3. Dietas fornecidas aos animais

As dietas com diferentes teores de fibras utilizadas foram: alto teor de fibra (15%) – Dieta HF (SF11-029), zero teor de fibra (0%) – Dieta ZF (SF11-028) e quantidades normais de fibra (5%) – Dieta Ctr (AIN93G) adquiridas de empresas especializadas, Glenn Floresta, Austrália.

Ingrediente	Gramas/Kg da dieta
Amido de milho cozido	529,49
Caseína	200,00
Sucrose	100,00
Gordura	70,00
Fibra (celulose)	50,00
Minerais	35,00
Vitaminas	10,00
L-cisteína	3,00
Bitartrato de colina	2,50
Total	1.000,00

Tabela 1. Composição da dieta controle fornecida aos camundongos

4.4. Preparo do conteúdo cecal estéril (CCE)

Como doadores de CCE, foram utilizados camundongos C57BL/6 machos entre 8 e 12 semanas de idade, mantidos em microisoladores estéreis, com livre acesso a água, ciclo diurno e noturno de 12 horas, temperatura e umidade controladas provenientes do Laboratório de animais transgênicos (LAT-BIORIO), alimentados por duas semanas com dietas com diferentes concentrações de fibra. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação de CO₂ e o ceco extraído. O conteúdo cecal foi coletado, seu volume aferido e posteriormente foi diluído em meio PYG (1:1 v/v), em seguida filtrado através de duas camadas de gaze cirúrgica e autoclavados (121°C, 120min). As alíquotas foram armazenadas a -20°C para experimentos posteriores.

4.5. Indução de abscessos intra-abdominais

A cepa 638R de *B. fragilis* foi crescida em caldo BHI-PRAS até o meio da fase exponencial (18 h) e diluída em caldo PYG-PRAS (peptona, extrato de levedura e glicose) (Jousimies-Somer

et al., 2002) até $1,5 \times 10^8$ UFC/animal (correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland). Ao inóculo foi acrescentado conteúdo cecal estéril (CCE) numa proporção 1:1 v/v e injetados intraperitonealmente, em um volume final de 200 μ L.

4.6. Avaliação da perda de peso

A aferição do peso corporal dos animais foi realizada no mínimo em 4 momentos após a indução de peritonite. Os camundongos foram pesados e identificados individualmente. Para o cálculo da porcentagem da perda de peso foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Variação do peso} = \frac{\text{peso observado} \times 100}{\text{peso inicial (dia 0)}}$$

Os resultados foram expressos como alteração percentual do peso durante o período de indução da peritonite, em relação ao peso inicial.

4.7. Avaliação dos abscessos abdominais

Para avaliação de abscessos os animais foram eutanasiados 7 dias após a infecção, através de inalação de CO₂ e necropsiados. Os abscessos presentes na cavidade peritoneal foram quantificados e medidos (em mm), sendo classificados em cinco grupos para obtenção do *score*: grupo PP, até 1 mm, recebendo *score* 1; grupo P, até 2 mm, recebendo *score* 2, grupo M, até de 3 mm, recebendo *score* 3, grupo G, até 4 mm, recebendo *score* 4 e grupo GG, até 5 mm ou maior, recebendo *score* 5. O *score* total para os abscessos contados em cada animal foi obtido utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Score total} = (\text{quantidade de abscessos PP} \times \text{score}) + \dots + (\text{quantidade de abscessos GG} \times \text{score})$$

4.8. Obtenção de macrófagos e células dendríticas murinas derivados de medula óssea

Foram utilizados macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea (BMDM e BMDC, respectivamente) de camundongos. Células da medula óssea das bacias, fêmures e tíbias foram obtidas a partir da centrifugação dos ossos, lavadas e cultivadas em placas de Petri não tratadas (para BMDM) e garrafas de cultura de 75 cm² (para BMDC) a 37°C, em atmosfera úmida a 5% de CO₂ na presença de 30% de meio condicionado de células L929 (M-CSF - para macrófagos) ou 12,5 GM-CSF (Peprotech) (para células dendríticas) em meio RPMI 1640 suplementado com 20% ou 10% de soro fetal bovino (para BMDM e BMDC, respectivamente), 100 U/mL penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 1 mM de piruvato de sódio. Após 3 dias de incubação, foi

adicionado meio novo para suplementação (10mL). Ao final da diferenciação (7 dias em cultura), as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (10⁶ células/poço) e estimuladas no 8º dia com diferentes estímulos. Nos experimentos em que inibidores como citocalasina-D, CA-074-Me, mitoTEMPO e KCl foram utilizados, as células foram tratadas durante 1 hora antes do estímulo com CCE por 6 horas. Após 6 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de citocinas utilizando a técnica de ELISA.

4.9. ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para quantificação de citocinas

Para quantificar as citocinas, foi realizada a técnica de ELISA utilizando o sobrenadante de cultura nos ensaios *in vitro*. Todos os reagentes são provenientes do DuoSet ELISA kit R&D System e o protocolo da reação seguiu as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas *overnight* com anticorpos monoclonais murino (anticorpos de captura) para cada alvo. Após o bloqueio durante 2 horas, a fim de evitar a ligação não específica, a proteína recombinante ou sobrenadantes de cultura foram adicionados. As citocinas foram detectadas após a ligação dos anticorpos de detecção (biotinilados) e adição da estreptavidina-peroxidase. Após adição do substrato, a reação colorimétrica resultante foi parada pela adição de ácido sulfúrico 2N, e as placas foram lidas a 492nm por um leitor de microplacas. As concentrações de citocinas foram determinadas por interpolação de uma curva padrão e apresentadas como pg/mL (\pm desvio padrão da média).

4.10. Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH)

A liberação de LDH no meio de cultura foi avaliada como marcador de dano à membrana plasmática e indicador de piroptose. A atividade da LDH foi medida através de leitura em espectrofotômetro usando um kit comercial (Doles). Após as células serem estimuladas, os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de ensaio enzimático e os procedimentos obedeceram às instruções do fabricante. A absorbância foi registrada a 490nm. O percentual de liberação de LDH foi calculado segundo a fórmula:

$$\% \text{ liberação} = \frac{[\text{LDH}] \text{ simples}}{[\text{LDH}] \text{ total}} \times 100$$

Onde [LDH] simples foi o nível de LDH liberado no meio subtraído do controle, e o [LDH] total foi o conteúdo de LDH no controle positivo após a adição de solução de lise (Triton 0,9 %).

4.11. Ensaio de FLICA para detecção de caspase-1 ativa

Em paralelo à produção de IL-1 β , foi avaliada a expressão de caspase-1 ativa como uma metodologia complementar no estudo da ativação de inflamossomo. Para avaliar a ativação da caspase-1, 2x10⁶ macrófagos derivados de medula óssea foram estimulados com LPS e Goma Guar por 6 horas, e então as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. A marcação da caspase-1 ativa foi feita por 40 minutos com o reagente carboxyfluorescein FLICA (FAM–YVAD–FMK, Immunochemistry Technologies, LLC), como recomendado pelo fabricante. Após esse período, as células foram adquiridas e avaliadas no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD).

4.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software). As diferenças entre dois grupos foram avaliadas pelo teste t de Student. Para efeito de comparação múltipla, foi utilizado ANOVA one-way com Bonferroni pós-teste. Para peso corporal, utilizamos ANOVA two-way com Bonferroni pós-teste. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas ao nível de p. * ou # p <0,05; ** ou ## p <0,01; *** ou ### p <0,001.

5. RESULTADOS

5.1. A produção de IL-1 β induzida por CCE é dependente da expressão de componentes do inflamossomo NLRP3

Nos últimos anos, nosso grupo tem se dedicado a estudar os mecanismos imunológicos, principalmente envolvidos na resposta imune inata, que contribuem para o desenvolvimento de abscessos durante a peritonite experimental murina induzida por *B. fragilis* e CCE. Resultados prévios mostram que o CCE isoladamente, mas não *B. fragilis*, induz a secreção de IL-1 β *in vivo* e *in vitro* (**Figuras 7, 8 e 9**), e que a sinalização desta citocina, através do seu receptor IL-1R, contribui significativamente para o desenvolvimento da peritonite (**Figura 6**). Sendo assim, o primeiro objetivo deste projeto foi estabelecer qual inflamossomo está envolvido na produção desta citocina neste modelo. O inflamossomo alvo foi o composto pelo receptor NLRP3, pela proteína adaptadora ASC e pela enzima caspase-1, uma vez que este é o inflamossomo mais estudado e com maior variedade de ativadores já descritos até o momento.

Utilizando macrófagos derivados de medula óssea de camundongos deficientes no receptor NLRP3, ou nos componentes do inflamossomo ASC e caspase-1/11 estimulados *in vitro* com CCE

(**Figura 12A**), observamos uma drástica redução na produção de IL-1 β quando comparadas a células de animais C57BL/6 WT, sendo o mesmo fenótipo também observado para células dendríticas (**Figura 12C**). O camundongo deficiente de caspase-1 usado neste trabalho foi gerado a partir de células embrionárias provenientes de animais da linhagem 129, que carregam uma mutação no gene que codifica outra caspase inflamatória, a caspase-11 (Kayagaki *et al.*, 2011). Apesar dos inúmeros cruzamentos para o estabelecimento do background genético da linhagem C57BL/6, devido a proximidade dos genes da caspase-1 e da caspase-11, não foi possível reverter este fenótipo, e por este motivo este animal é aqui citado como caspase-1/11^{-/-}. Utilizamos como controle da secreção da citocina macrófagos primados com *B. fragilis* e estimulados com alum, uma molécula particulada que serve como segundo sinal para ativação de NLRP3 e, como esperado, também foi observada a redução da produção de IL-1 β (**Figura 12B**).

Ainda analisando os gráficos das figuras 12A e 12B, nós observamos que macrófagos provenientes de animais deficientes no receptor da IL-1 apresentam uma redução parcial, porém significativa, na produção de IL-1 β quando comparados ao WT. Isso nos leva a crer que a citocina é responsável por uma sinalização autócrina ou parácrina das células via o seu receptor, levando a uma amplificação da resposta.

Outro parâmetro avaliado como controle foi a produção de TNF- α , uma citocina dependente apenas do primeiro sinal, ou seja, dependente de NF- κ B e independente de inflamossomo para ser secretada pela célula. Os resultados mostram que, como esperado, independente da expressão dos componentes do inflamossomo, as células produzem essa citocina de forma semelhante (**Figura 12D**). Até o momento, nossos dados sugerem que o CCE é capaz de ativar o inflamossomo NLRP3 e levar a secreção de IL-1 β , tanto em macrófagos como em células dendríticas.

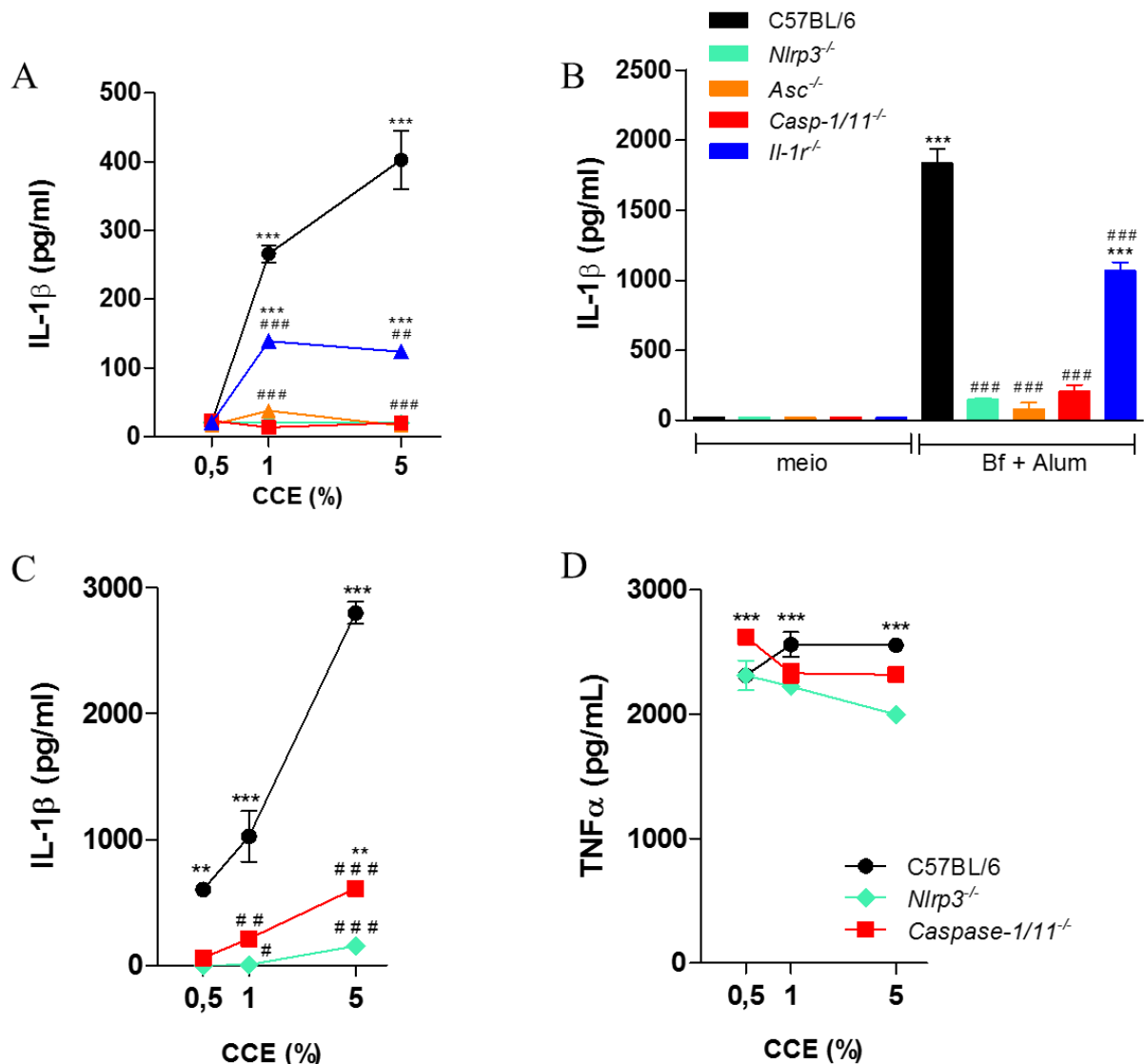


Figura 12. A produção de IL-1 β induzida por CCE é dependente da expressão de componentes do inflamossomo NLRP3. Macrófagos (A e B) e células dendríticas (C e D) de camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Caspase 1/11*^{-/-} e *Il-1r*^{-/-} foram estimulados com diferentes concentrações de CCE (% v/v) ou com *B. fragilis* (MOI: 50) + Alum (500 μ g/mL) durante 6 horas a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β (A-C) e TNF- α (D) por ELISA. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes; os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o meio; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 em comparação com células WT.

5.2. O eixo NLRP3-Caspase-1-IL-1R é essencial para o desenvolvimento da peritonite

Depois de observar a importância do inflamossomo NLRP3 em experimentos *in vitro*, avaliamos a importância desta via em experimentos *in vivo*, utilizando o modelo de peritonite. Vimos que animais deficientes em NLRP3 e caspase-1/11 inoculados intraperitonealmente com *B.*

fragilis e CCE apresentaram uma atenuação da perda de peso (**Figura 13A**). Observamos também que esses mesmos animais apresentaram uma drástica redução no *score* de abscessos após 7 dias de infecção (**Figura 13B**), assim como observado para animais deficientes no receptor da IL-1, demonstrando um fenótipo protetor a peritonite. Em conjunto, esses dados nos mostram que o eixo NLRP3-caspase1-IL-1R é essencial para o desenvolvimento de peritonite induzida por *B. fragilis* e CCE.

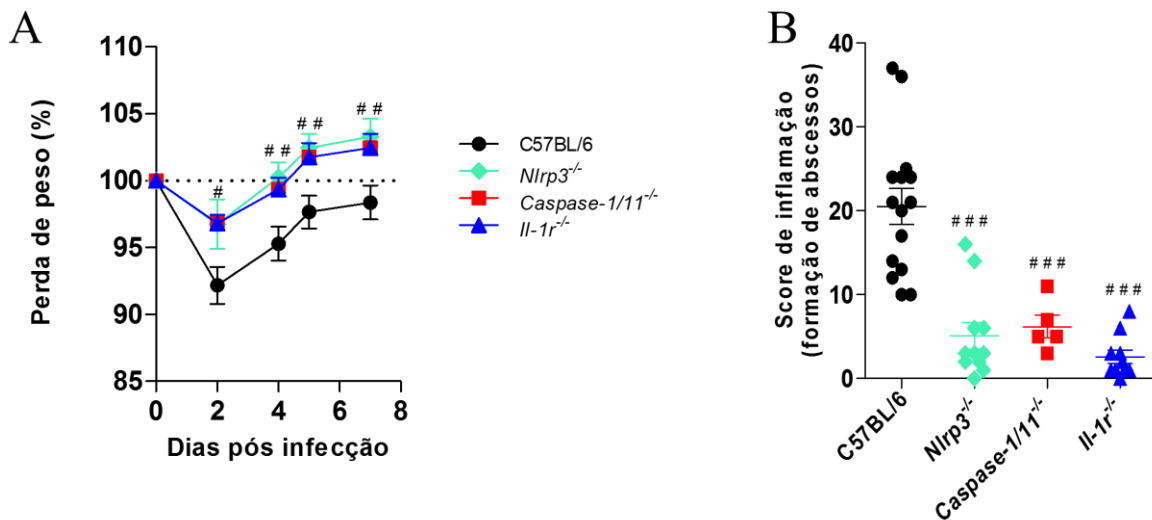


Figura 13. O eixo NLRP3-caspase-1-IL-1R é essencial para o desenvolvimento da peritonite. Camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *caspase-1/11*^{-/-} e *Il-1r*^{-/-} foram inoculados intraperitonealmente com *B. fragilis* e CCE como descrito nos métodos. (A) Monitoramento do peso corporal foi realizado ao longo de 7 dias. (B) *Score* de inflamação foi determinado no dia 7 após a infecção utilizando o número e tamanho de abscesso como parâmetros. Em A, os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de pelo menos 5 camundongos por grupo. Em B, cada símbolo representa um animal. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em comparação com camundongos C57BL/6.

5.3. A secreção de IL-1 β induzida por CCE é parcialmente dependente da sinalização via receptor purinérgico P2X₇ em macrófagos e células dendríticas

O ATP extracelular pode ser proveniente de diversas fontes, como células necróticas ou apoptóticas, células endoteliais e células inflamatórias ativadas, que liberam este nucleotídeo no meio extracelular (Eltzschig, Sitkovsky e Robson, 2012). Este nucleotídeo é o principal ativador do receptor P2X₇, levando a abertura de poros na membrana celular, resultando no efluxo de potássio e por consequência ativando o inflamossomo NLRP3 (Griffiths *et al.*, 1995; Gombault, Baron e Couillin, 2012) Sendo assim, nosso próximo passo foi investigar o papel desse receptor na produção da citocina IL-1 β em macrófagos e células dendríticas estimulados com CCE. Nossa

hipótese era que o CCE poderia induzir um estresse celular e a liberação de ATP para o meio extracelular, e este seria um mecanismo envolvido na ativação de NLRP3.

Utilizando macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea provenientes de animais WT e de animais deficientes no receptor P2X₇, observamos uma discreta, mas significativa, diminuição na produção da IL-1 β após estimulação com CCE (**Figura 14A e 14C**). O mesmo foi observado quando utilizamos moléculas particuladas que sabidamente ativam o inflamossomo NLRP3, como o alum. Como esperado, quando utilizamos o ATP em células P2X₇^{-/-} primadas com LPS, não há a produção de IL-1 β . Quando avaliamos os níveis de TNF- α , vimos que estes se mantem semelhantes, independente dos estímulos utilizados, entre os dois grupos (

Figura 14B e 14D). Com isso, esses dados sugerem que há a dependência parcial do receptor P2X₇ na produção de IL-1 β induzida por CCE em experimentos *in vitro*.

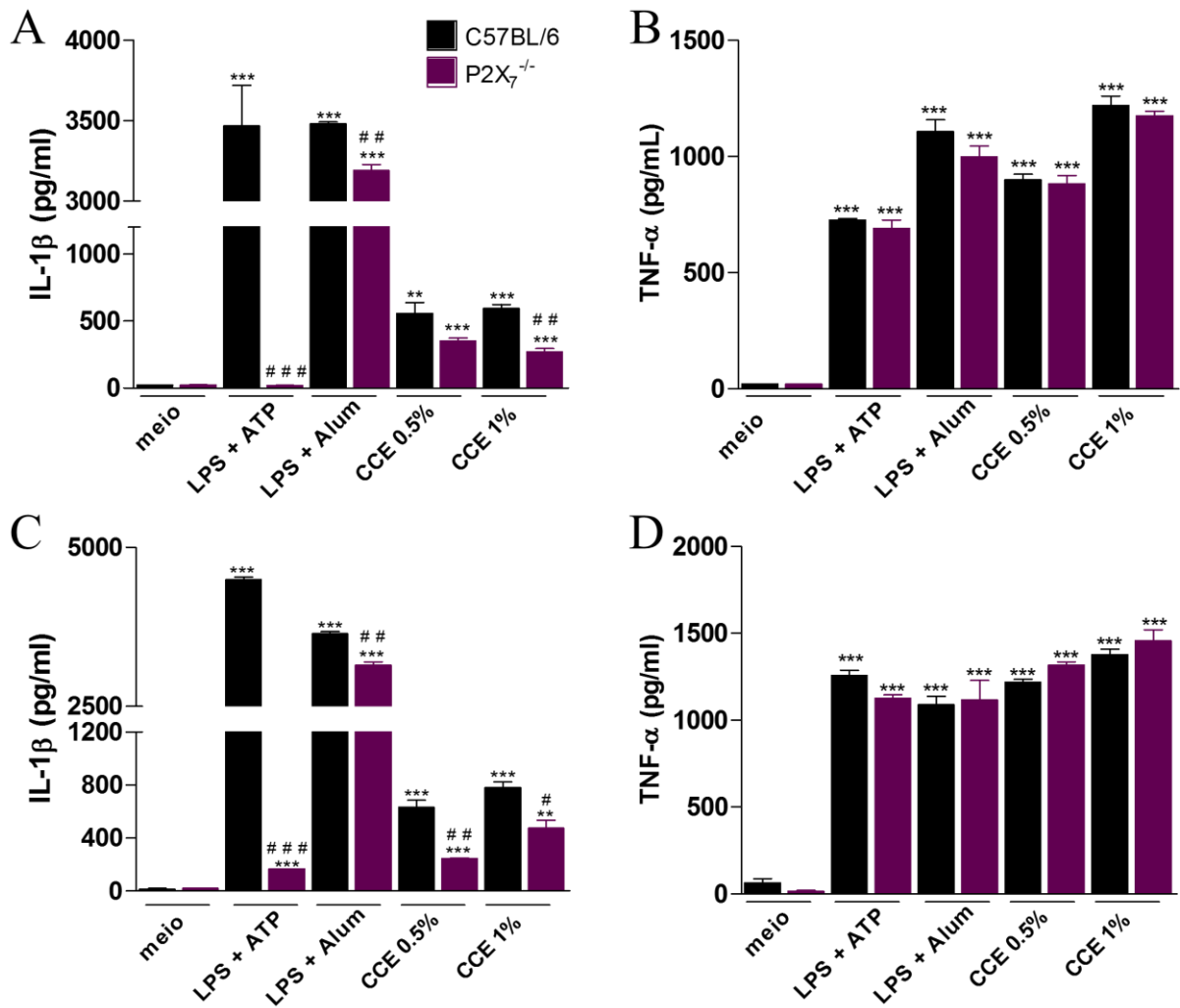


Figura 14. A secreção de IL-1 β induzida por CCE é parcialmente dependente da sinalização via receptor purinérgico P2X7 em macrófagos e células dendríticas. (A e B) Macrófagos e (C e D) células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6 e P2X7^{-/-} foram estimulados com diferentes concentrações de CCE (% v/v), LPS (500 ng/mL) ou LPS + Alum (500 μ g/mL) durante 6 horas a 37°C. Nos últimos 30 min de incubação, o ATP (5 mM) foi adicionado quando indicado, e os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β (A e C) e TNF- α (B e D) por ELISA. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes; os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o meio; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 em comparação com células WT.

5.4. Sinalização via P2X7 não é essencial para o desenvolvimento de peritonite

Como visto no resultado anterior, a produção de IL-1 β é parcialmente dependente da sinalização via P2X7. Após essa observação, decidimos avaliar se essa sinalização é importante para o desenvolvimento de peritonite induzida por *B. fragilis* em combinação com CCE. Após a indução de peritonite, vimos que os animais deficientes nesse receptor apresentam perda de peso (**Figura 15A**) e *score* de inflamação (**Figura 15B**) semelhantes aos animais WT. Isso nos leva a

crer que a sinalização via receptor P2X₇ não é essencial para o desenvolvimento de peritonite induzida por *B. fragilis* e CCE.

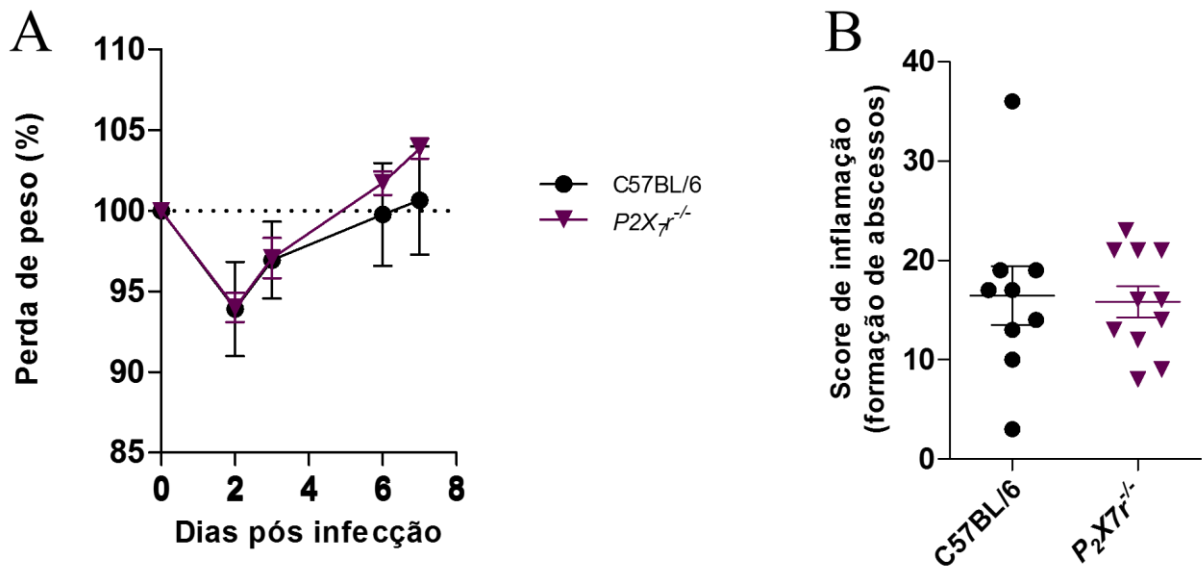


Figura 15. Sinalização via P2X₇ não é essencial para o desenvolvimento de peritonite. Camundongos C57BL/6 e P2X₇^{-/-} foram inoculados i.p. com *B. fragilis* na presença de CCE (v/v). (A) Monitoramento do peso corporal e (B) *Score* de abscesso. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. Em A, os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de pelo menos 5 camundongos por grupo. Em B, cada símbolo representa um animal. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. Não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros analisados.

5.5. Fagocitose, catepsina lisossomal, ROS mitocondrial e efluxo de potássio são mecanismos essenciais para a produção de IL-1 β induzida por CCE

Como já foi explicitado anteriormente, existem bem descritas até o momento 3 vias não excludentes que levam à ativação de NLRP3, dentre elas a fagocitose de componentes particulados, levando à desestabilização lisossomal e liberação de catepsinas lisossomais para o citoplasma, a geração de espécies reativas de oxigênio, como ROS mitocondrial, e o efluxo de potássio via poros na membrana celular. Para esclarecer qual (is) deste (s) mecanismo (s) está (ão) envolvido (s) na indução de IL-1 β por CCE, utilizamos os seguintes inibidores dessas vias:

- **Citocalasina D:** inibidor da polimerização de actina, levando à inibição da fagocitose;
- **CA-074-Me:** inibidor de catepsinas lisossomais (catepsina B e catepsina L);

- **MitoTEMPO**: antioxidante alvo para mitocôndria, um sequestrador específico de superóxido mitocondrial;
- **Altas concentrações de Cloreto de potássio (KCl)**: inibidor de efluxo de potássio, pois o meio extracelular estará supersaturado deste íon.

Surpreendentemente, quando tratamos macrófagos provenientes de animais C57BL/6 com os inibidores supracitados e os estimulamos após 1 hora com CCE, vimos que todos foram capazes de abolir a secreção de IL-1 β (**Figura 16A**). Quando avaliamos a produção de TNF- α como controle (**Figura 16B**), observamos apenas uma leve diminuição dos níveis desta citocina nos pontos pré tratados com citocalasina D e CA-074-Me. No entanto, mesmo ocorrendo essa diminuição, isso não parece indicar um comprometimento do primeiro sinal e, conseqüentemente, da produção de pró-IL-1 β , de forma que justifique os baixos níveis desta citocina madura no sobrenadante. Esses dados nos levam a crer que a fagocitose de componentes que levem ao rompimento do fagolisossomo e conseqüente liberação de catepsinas lisossomais, como moléculas particuladas, a liberação de ROS mitocondrial e o efluxo de potássio são mecanismos determinantes na produção de IL-1 β induzida por CCE em cultura de macrófagos.

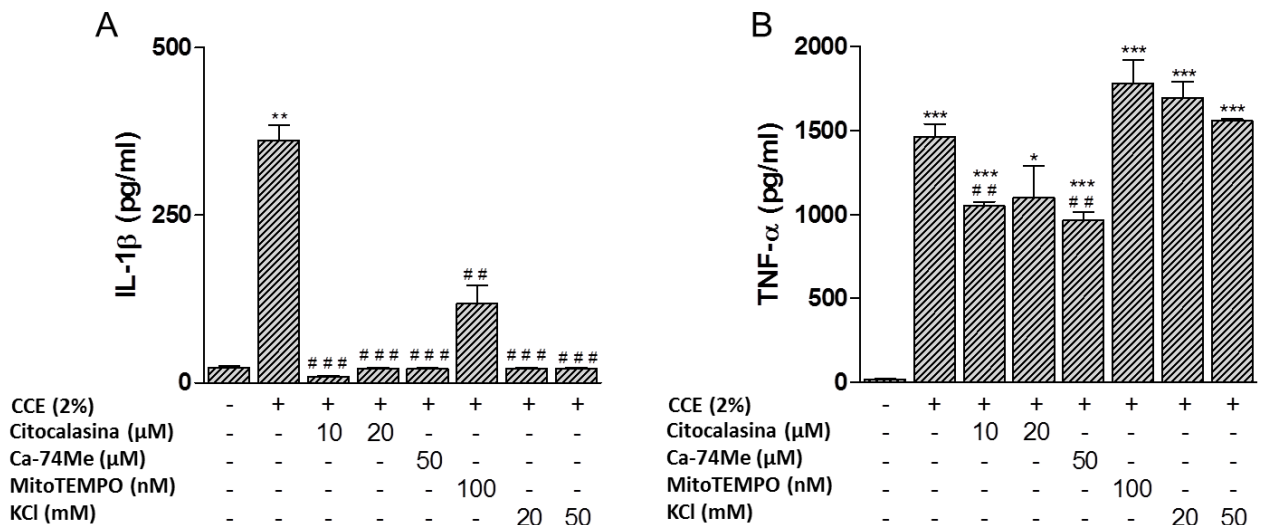


Figura 16. Fagocitose, catepsina lisossomal, ROS mitocondrial e efluxo de potássio são mecanismos essenciais para a produção de IL-1 β induzida por CCE. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com citocalasina D (10 ou 20 μ M), CA-074-Me (50 μ M), MitoTEMPO (100 nM) ou KCl (20 ou 50 mM) por 1 h. Após este tempo, os macrófagos foram estimulados com CCE (2% v/v) durante 6 horas a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β (A) e TNF- α (B) por ELISA. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes; os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se teste t -Student. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o meio; # #p<0,01; # # #p<0,001 em comparação com CCE.

5.6. Material particulado presente no CCE é essencial para indução de IL-1 β

Uma vez que nossos resultados anteriores sugeriram a participação de algo particulado presente no CCE na indução de IL-1 β , fomos avaliar se o sobrenadante desse conteúdo ausente do material mais denso, era capaz de levar a produção de IL-1 β . Para a realização desse experimento, centrifugamos o CCE a 60g por 1 minuto para a remoção das partículas maiores e em seguida utilizamos o sobrenadante para estimular macrófagos e quantificar a produção de IL-1 β . Quando estimulados com o sobrenadante do CCE, os macrófagos não produziram IL-1 β , oposto ao já descrito com o CCE íntegro (**Figura 17A**). No entanto, a produção de TNF- α foi preservada (**Figura 17B**). Isso nos permite concluir que, de fato, algo particulado precipitável presente no CCE está envolvido na ativação do inflamossomo e consequente produção de IL-1 β .

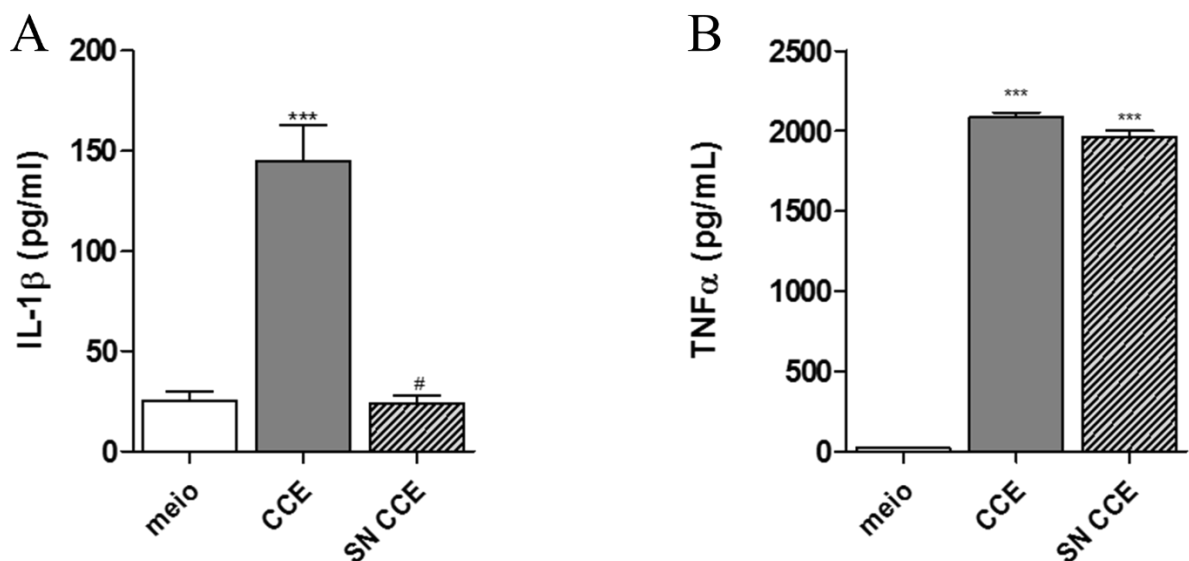


Figura 17. Material particulado presente no CCE é essencial para indução de IL-1 β . Macrófagos de camundongos C57BL/6 foram estimulados com CCE íntegro ou sobrenadante de CCE (ambos na proporção 1% v/v) durante 6 horas a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β e TNF- α por ELISA. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes; os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. *** P <0,001 quando comparado com o meio; # P <0,05 em comparação com CCE.

5.7. Material particulado presente no CCE é essencial para o desenvolvimento de peritonite

Nosso próximo passo foi observar se esse material particulado também era determinante no desenvolvimento da peritonite. Para isso, utilizamos o mesmo sobrenadante de CCE do experimento *in vitro*, obtido após centrifugação a 60g por 1 minuto, e o inoculamos em combinação

com *B. fragilis* em animais C57BL/6. Após 7 dias observamos que os animais inoculados com o sobrenadante do CCE apresentam uma atenuação na perda de peso quando comparados aos animais inoculados com o CCE íntegro (**Figura 18A**). Em relação ao *score* de abscessos, observamos que animais inoculados com o sobrenadante do CCE + *B. fragilis* não apresentam desenvolvimento de abscessos quando comparados aos animais que foram inoculados com o CCE íntegro (**Figura 18B**). Esses resultados corroboram com o que foi observado em experimentos *in vitro* mostrando que o material particulado é essencial tanto para a produção de IL-1 β como para o desenvolvimento da peritonite.

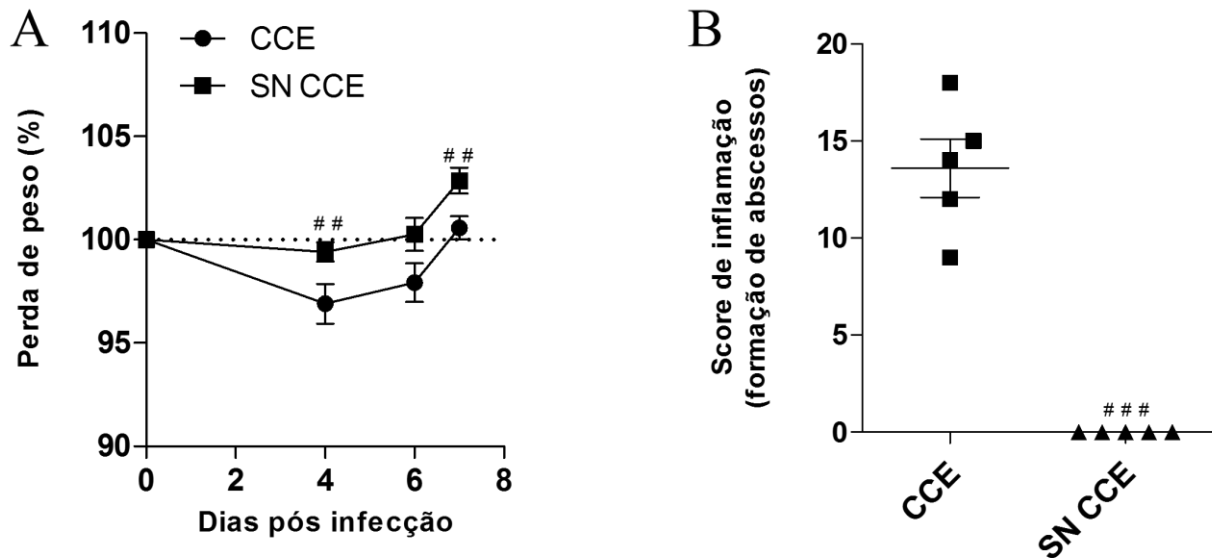


Figura 18. Material particulado presente no CCE é essencial para o desenvolvimento de peritonite. Camundongos C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com *B. fragilis* na presença de CCE ou do sobrenadante de CCE, obtido após centrifugação a 60 g por 1 minuto, como descrito nos métodos. (A) Monitoramento do peso corporal e (B) Score de abscesso foi determinado em 7 dias após a infecção. Os dados são representativos de 3 experimentos, embora a figura represente 1 experimento. Em A, os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de pelo menos 3 camundongos por grupo. Em B, cada símbolo representa um animal. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. ## P < 0,01; ### P < 0,001 em comparação com animais inoculados com *B. fragilis* e CCE íntegro.

5.8. Fibra presente no CCE contribui para a secreção de IL-1 β

Como observado até aqui, nossos dados mostram que um componente particulado, possivelmente derivado da dieta, presente no CCE é essencial para a ativação do inflamossomo, produção de IL-1 β e desenvolvimento da peritonite. Tendo isso em vista, nosso próximo objetivo foi avaliar se carboidratos não digeríveis provenientes da dieta, como a fibra, estão envolvidos

nesta resposta. Para isso, obtivemos CCE de três grupos diferentes de camundongos alimentados com diferentes dietas durante duas semanas:

- Dieta controle padrão (CCE ctr) – 4,5% de fibra;
- Dieta *zero* fibra (CCE ZF) – 0% de fibra;
- Dieta *high* fibra (CCE HF) – 15% de fibra.

Ao fim das duas semanas os camundongos foram eutanasiados e o conteúdo cecal recolhido e processado como descrito no item 4.4 da metodologia. Ao utilizar esses conteúdos para estimular macrófagos (**Figura 19A**) e células dendríticas (**Figura 19C**), observamos que o CCE HF induziu uma maior produção de IL-1 β , enquanto que a ausência de fibra no CCE ZF promoveu uma redução drástica dessa produção, ambos quando comparados ao CCE ctr. Embora essa observação da alteração dos níveis de IL-1 β tenha sido notada, não houve diferença entre os níveis de secreção de TNF- α (**Figuras 19B e 19D**). Este dado corrobora com a hipótese anteriormente proposta de que a fibra particulada presente no CCE contribui para a secreção de IL-1 β .

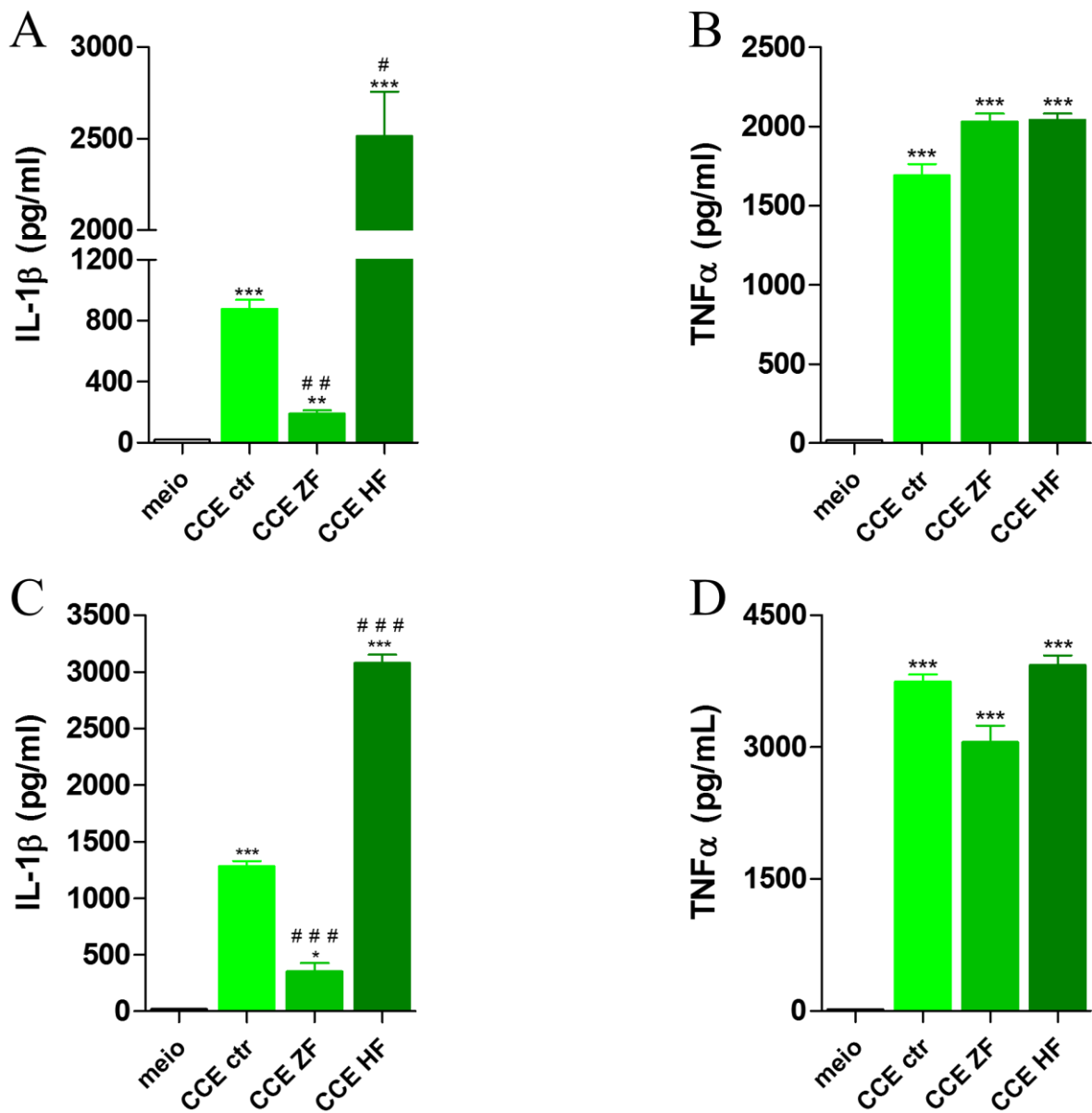


Figura 19. Fibra presente no CCE contribui para a secreção de IL-1 β . Macrófagos (A e B) e células dendríticas (C e D) derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram estimulados durante 6 horas a 37°C com CCE (1% v/v) obtidos de camundongos alimentados com dieta controle (4,5% de fibra – CCE Ctr), dieta sem fibra (0% de fibra – CCE ZF) ou dieta rica em fibra (15% de fibra – CCE HF), como descrito nos métodos. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β (A e C) e TNF- α (B e D) por ELISA. Os dados são representativos de pelo menos 4 experimentos independentes. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se teste t -Student. * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 quando comparado com o meio; # P <0,05; ## P <0,01; ### P <0,001 em comparação com CCE ctr.

Posterior à observação de que a fibra é importante na secreção de IL-1 β induzida por CCE, avaliamos se este efeito é mediado pelo inflamossomo NLRP3, como uma prova de conceito da nossa hipótese. Observamos que, apesar do CCE HF induzir uma maior produção de IL-1 β quando

comparado ao CCE ctr em macrófagos selvagens, este fenômeno se mostrou ser completamente dependente de NLRP3 e caspase-1/11, pois macrófagos deficientes nesses componentes não apresentaram este aumento na produção de IL-1 β em resposta ao CCE HF (**Figura 20A**). Entretanto, a produção de TNF- α entre os diferentes macrófagos se manteve semelhante (**Figura 20B**).

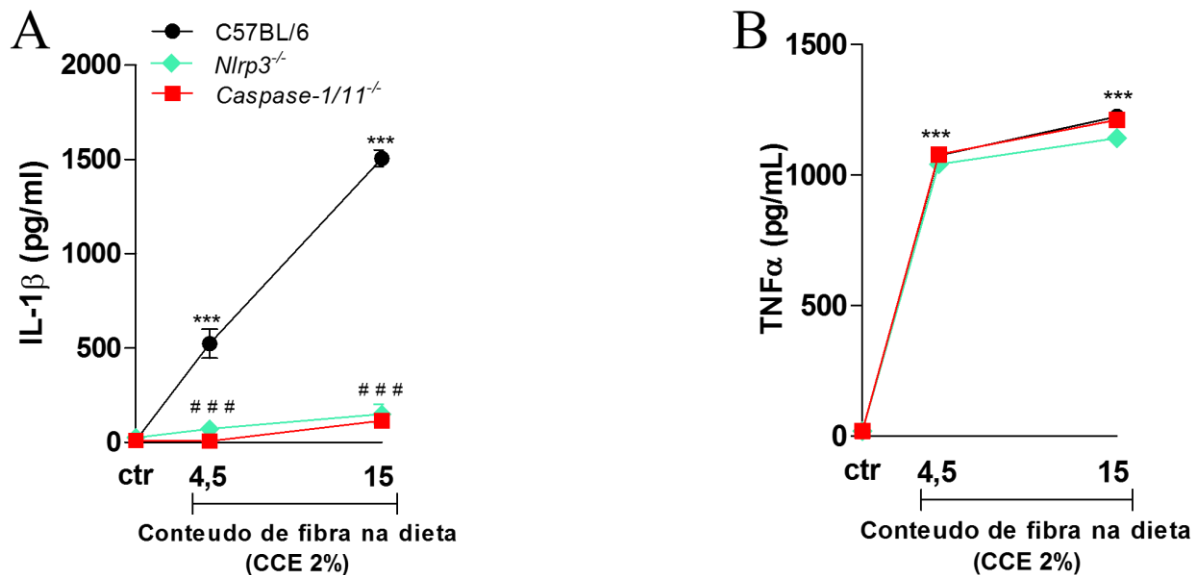


Figura 20. A fibra da dieta leva a ativação do inflamossomo NLRP3 e secreção de IL-1 β . Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-} e *Caspase 1/11*^{-/-} não foram estimulados (ctr) ou foram estimulados com CCE (2% v/v) obtidos de camundongos alimentados com dieta controle (4,5) ou dieta rica em fibra (15) durante 6 horas a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β (A) e TNF- α (B) por ELISA. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni.*** P <0,001 quando comparado com o meio (ctr); ### P <0,001 em comparação com CCE ctr.

5.9. Teor de fibra do CCE é essencial para o desenvolvimento da peritonite

Após estabelecer que a quantidade de fibra é determinante na indução da produção de IL-1 β e que esta resposta é mediada por NLRP3, nosso próximo objetivo foi ver se a quantidade de fibra também está envolvida no agravamento da peritonite. Após inocular camundongos C57BL/6 intraperitonealmente com os três diferentes CCEs na presença de *B. fragilis*, nós observamos ao longo de 7 dias que os animais inoculados com CCE HF apresentaram uma maior perda de peso, enquanto que animais inoculados com CCE ZF apresentaram uma atenuação na perda peso, ambos quando comparados aos animais inoculados com CCE ctr (**Figura 21A**). No que tange ao desenvolvimento da peritonite, observamos o mesmo perfil: animais que foram inoculados com o

CCE HF apresentaram um maior *score* de abscessos e os animais inoculados com o CCE ZF apresentaram um menor *score* de abscessos, ambos quando comparados aos animais inoculados com CCE ctr, sugerindo que a fibra apresenta um impacto direto na manifestação clínica da peritonite (**Figura 21B**).

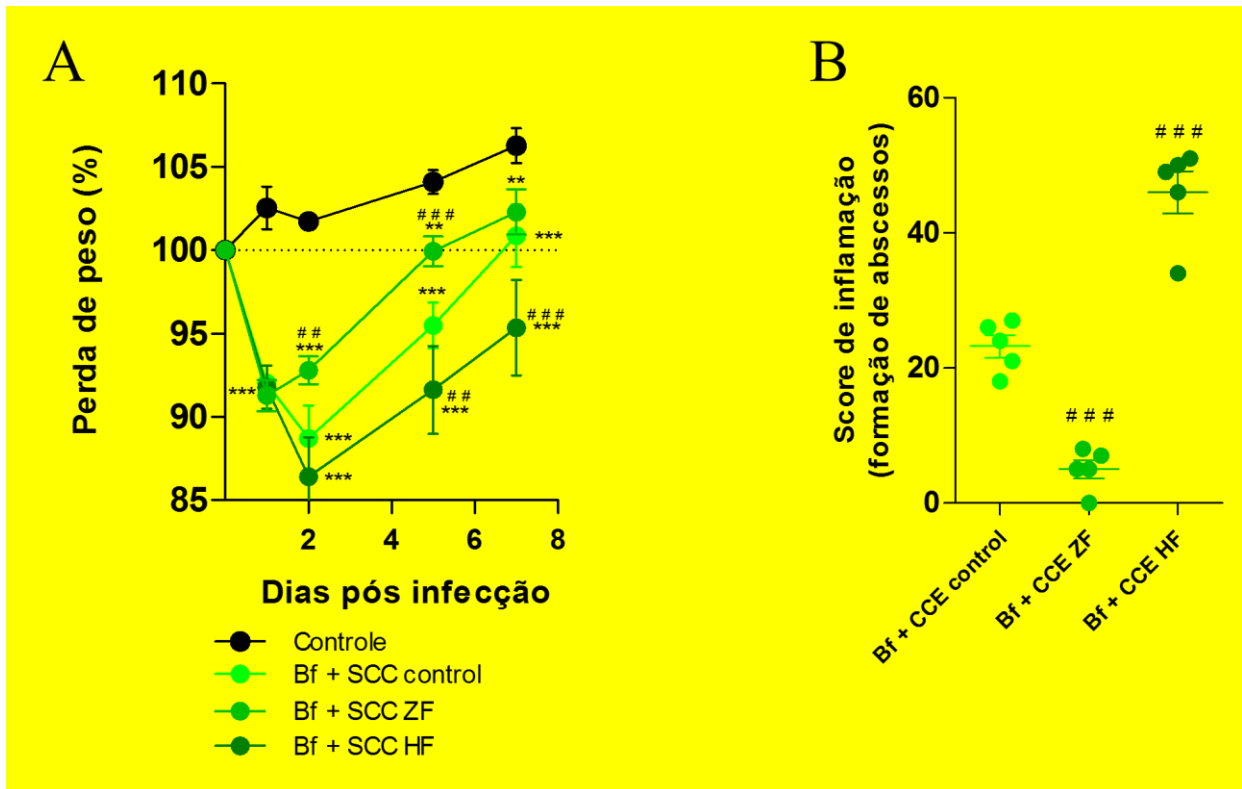


Figura 213. Teor de fibra do CCE é essencial para o desenvolvimento da peritonite. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com PBS (controle) ou com *B. fragilis* em combinação com CCE de camundongos alimentados com dieta controle (Bf + CCE Ctr), dieta sem fibra (Bf + CCE ZF) ou dieta rica em fibra (Bf + CCE HF), como descrito nos métodos. (A) Monitoramento do peso corporal e (B) Score de inflamação, determinado após 7 dias de infecção, utilizando o número e o tamanho de abscessos intra-abdominais como parâmetros. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. Em A, os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. Em B, cada símbolo representa um animal. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ quando comparado com o controle (em A); ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ quando comparado com o Bf + CCE ctr.

5.10. Fibra purificada é capaz de ativar caspase-1 e levar a produção de IL-1 β em macrófagos primados com LPS

Como já foi supracitado, o CCE é constituído por compostos diversos, como produtos da microbiota e da dieta. Para confirmar que a fibra proveniente da dieta é, de fato, responsável pela ativação do inflamossomo e produção de IL-1 β , utilizamos uma fibra purificada disponível

comercialmente, a Goma Guar, para estimular macrófagos primados com LPS (usado aqui como indutor do primeiro sinal que leva a produção da pro-IL-1). Observamos que a fibra levou à ativação de caspase-1, já que houve um aumento do percentual de células positivas para FLICA (**Figura 22A**). Ao estimular os macrófagos somente com LPS ou somente com a fibra purificada não observamos produção de IL-1 β , visto que cada um representa um sinal para a ativação do inflamossomo isoladamente. Já quando damos o primeiro sinal (LPS) e passada uma hora damos o segundo sinal (fibra purificada), observamos a produção de IL-1 β (**Figura 22B**). Corroborando nossos dados com CCE HF (**Figura 20A**), a produção de IL-1 β induzida pela fibra purificada é dependente de NLRP3 e caspase-1/11, tanto em macrófagos (**Figura 22C**), quanto em células dendríticas (**Figura 22D**). Esses resultados confirmam que a fibra proveniente da dieta pode atuar como um segundo sinal durante a peritonite, levando à ativação de inflamossomo e consequente produção de IL-1 β .

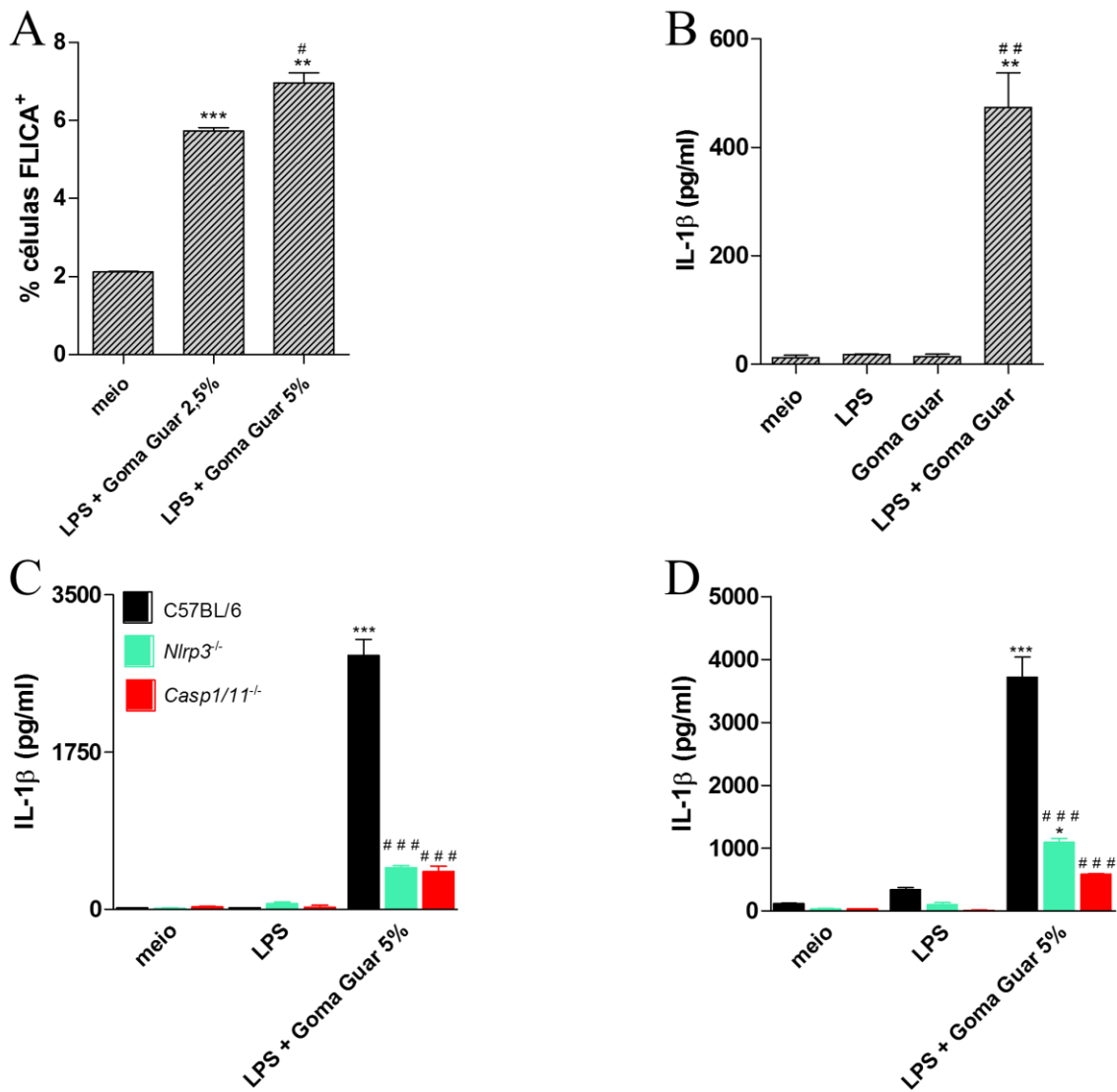


Figura 22. Fibra purificada é capaz de ativar caspase-1 e levar a produção de IL-1 β em macrófagos primados com LPS. (A e B) Macrófagos derivados de medula óssea obtidos de camundongos C57BL/6 foram primados com LPS (500 ng/mL) por 1h e em seguida estimulados com Goma Guar nas concentrações indicadas (% w/v). Em B, foi utilizada a concentração de 2,5% (w/v) Após 6 h, caspase-1 ativa foi avaliada por citometria de fluxo utilizando FAM-YVAD-FMK (FLICA) (A) e os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β por ELISA (B). (C e D) Macrófagos (C) e células dendríticas (D) de camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-} e *caspase1/11*^{-/-} foram primados com LPS (500 ng/mL) durante 1 h, e em seguida estimulados com Goma Guar (5% w/v), quando indicado. Após 6 h a 37°C, os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β por ELISA. Dados representativos de 2 experimentos independentes. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. ** P <0,01; *** P <0,001 quando comparado com o meio; # P <0,05; ## P <0,01 quando comparado com duas doses de Goma de Guar (A) ou em comparação com LPS sozinho (B).

5.11. A indução de IL-1 β por CCE ocorre de forma independente de caspase-11

Como já mencionado no início desta seção, as células deficientes para a caspase-1 utilizadas neste trabalho também são deficientes para a caspase-11. Esta caspase inflamatória, representada

pela caspase-4 em humanos, induz a via não canônica de ativação do inflamossomo NLRP3 (Kayagaki *et al.*, 2011). A maioria das bactérias Gram-negativas ativa essa via de sinalização mediada por caspase-11, resultando na liberação de IL-1 β e IL-18 (Kayagaki *et al.*, 2011). Neste contexto, a caspase-11 cliva gasdermina D, resultando em um fragmento amino-terminal que promove a ativação de caspase-1 de forma dependente de NLRP3, com consequente maturação de IL-1 β . Além disso, a caspase-11 ativa também pode desencadear a abertura de canais de panexina-1, que induz o efluxo de potássio e leva a ativação do inflamossomo NLRP3 (Yang *et al.*, 2015). Sendo assim, nossos resultados com células caspase-1/11^{-/-} não nos permitem concluir se a produção de IL-1 β induzida por CCE envolve a participação da via não canônica, dependente de caspase-11.

Para esclarecer isso, utilizamos macrófagos deficientes apenas em caspase-11 estimulados com os CCEs provenientes das dietas (ctr, HF e ZF). Observamos que as células deficientes na caspase-11 produzem IL-1 β de forma semelhante ou até mesmo em níveis maiores do que macrófagos WT (**Figura 23A**). Este mesmo fenótipo também foi observado quando utilizamos macrófagos provenientes de animais da linhagem 129 (dados não mostrados), que apresentam uma mutação em caspase-11 (Kayagaki *et al.*, 2011). Quando quantificamos o TNF- α (**Figura 23B**), observamos que não tivemos alterações nos seus níveis entre os grupos e estímulos avaliados. Assim, esses resultados evidenciam o papel fundamental da caspase-1 na indução de IL-1 β por CCE, já que macrófagos deficientes para a caspase-11 se comportam de maneira semelhante quando comparados a macrófagos WT.

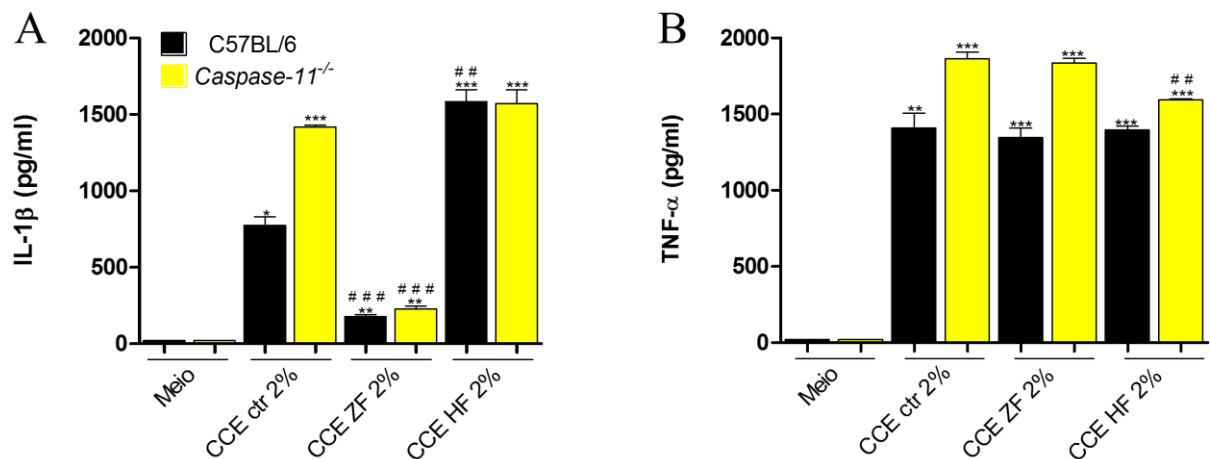


Figura 23. A indução de IL-1 β por CCE ocorre de forma independente de caspase-11. (A e B) Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e caspase-11^{-/-} foram estimulados durante 6 horas a 37°C com

CCE (2% v/v) obtidos de camundongos alimentados com dieta controle (4,5% de fibra – CCE Ctr), dieta sem fibra (0% de fibra – CCE ZF) ou dieta rica em fibra (15% de fibra – CCE HF), como descrito nos métodos. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de IL-1 β (A) e TNF- α (B) por ELISA. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se teste t -Student para comparação entre mesmo grupo e ANOVA com pós-teste Bonferroni para comparação entre WT e caspase-11^{-/-}. * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 quando comparado com o meio; # P <0,05; ## P <0,01; ### P <0,001 em comparação com CCE ctr da mesma linhagem.

5.12. CCE induz liberação de LDH em macrófagos de forma independente de NLRP3

Além de realizar a clivagem das citocinas pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas maduras (IL-1 β e IL-18), a caspase-1 pode também induzir uma morte celular programada, que leva células a liberarem seu conteúdo citoplasmático no espaço extracelular, intensificando a resposta inflamatória. Essa morte, chamada piroptose, é caracterizada pela ruptura da membrana plasmática celular após a formação de poros que levam ao extravasamento do conteúdo citoplasmático, liberando componentes como a enzima LDH (Bergsbaken, Fink e Cookson, 2009; Sollberger *et al.*, 2014; Nadatani *et al.*, 2016). Sendo assim, nós avaliamos se macrófagos estimulados com CCE, em paralelo a produção de IL-1 β , liberam LDH no sobrenadante da cultura, como um indicativo de indução de morte por piroptose. De fato, macrófagos derivados de medula óssea de animais WT, quando estimulados com CCE, apresentam um aumento na liberação de LDH em comparação aos macrófagos não estimulados. Já as células estimuladas somente com o *B. fragilis* não apresentam alteração significativa na liberação dessa enzima, bem como a adição da bactéria ao CCE não altera a resposta do mesmo, refletindo o que foi previamente observado para a produção de IL-1 β (**Figura 24A**). Esse resultado sugere que o CCE, mas não o *B. fragilis*, é capaz de induzir a piroptose em macrófagos. Como observado nos experimentos anteriores, a produção de IL-1 β induzida pelo CCE se mostrou dependente de NLRP3. Já quando avaliamos a liberação de LDH, observamos que macrófagos deficientes em NLRP3 não apresentam diferença quando comparados as células selvagens (**Figura 24B**), tanto em resposta ao CCE como ao alum, sugerindo que o mecanismo de morte por piroptose induzido por ambos os estímulos seja independente de NLRP3. Se o processo de liberação de LDH induzido por CCE depende de caspase-1 ou caspase-11, ainda é uma questão em aberto a ser investigada pelo nosso grupo.

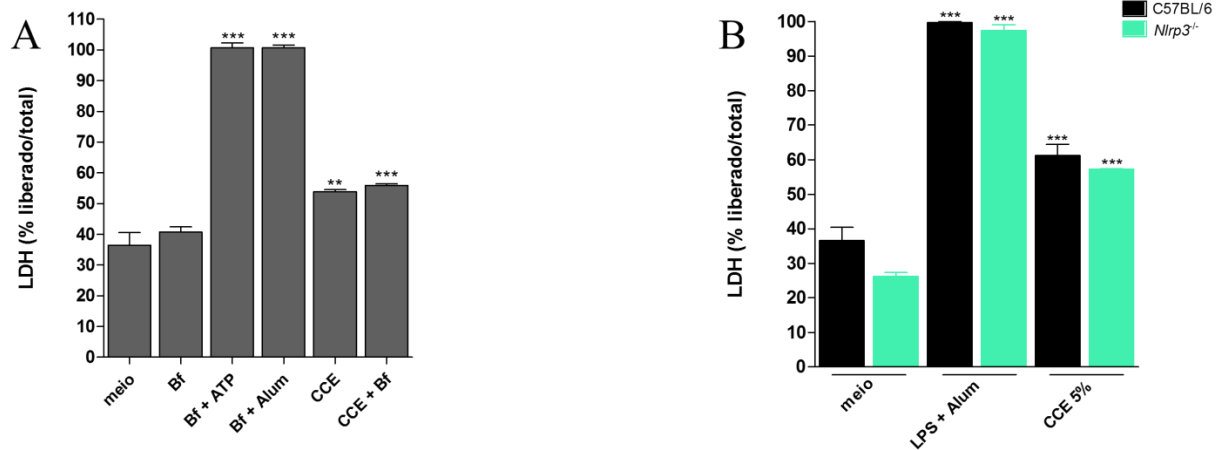


Figura 24. CCE induz liberação de LDH em macrófagos de forma independente de NLRP3. (A) Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram estimulados com CCE (5% v/v), *B. fragilis* (MOI: 50) e/ou alum (500 µg/mL) durante 6 horas a 37°C. Nos últimos 30 min de incubação, o ATP (5mM) foi adicionado quando indicado e os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de LDH. (B) Macrófagos de camundongos C57BL/6 e *Nlrp3*^{-/-} foram estimulados com LPS (500 ng/mL) + alum (500 µg/mL) ou CCE (5% v/v) durante 6 horas a 37°C, e os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de LDH. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. A significância foi calculada utilizando-se ANOVA com pós-teste Bonferroni. ** P <0,01; *** P <0,001 quando comparado com o meio.

6. DISCUSSÃO

Inúmeros são os microrganismos que convivem de forma comensal com os seres humanos, habitando diversas superfícies do corpo (Chow *et al.*, 2010). Dentre as bactérias simbiotes do TGI, podemos destacar *B. fragilis*, que mesmo representando apenas cerca de 0,5% das espécies de *Bacteroides* presentes no intestino (Polk e Kasper, 1977), tem papel fundamental no estabelecimento da tolerância imunológica intestinal, protegendo o hospedeiro contra doenças inflamatórias (Mazmanian, Round e Kasper, 2008). Entretanto, quando há uma ruptura das barreiras físicas intestinais, *B. fragilis* escapa para a cavidade peritoneal, se tornando um patógeno oportunista, sendo uma das bactérias mais virulentas e mais comumente isoladas em casos clínicos de peritonite e sepse abdominal (Smith, Rocha e Paster, 2006; Cohen-Paradosu *et al.*, 2011). Por expressar diversos fatores de virulência, *B. fragilis* tem sucesso durante o curso da infecção e consegue aderir, colonizar e se multiplicar em sítios extra-intestinais. Um dos mecanismos de resposta do hospedeiro a esta infecção é a formação de coleções purulentas denominadas abscessos, que tem a função de conter a bactéria, impedindo assim a sua disseminação (Gibson *et al.*, 1998; Troy *et al.*, 2010).

Em 1979, Onderdonk e colaboradores desenvolveram um modelo murino para o estudo de peritonite monomicrobiana amplamente utilizado até hoje. Esse modelo consiste no inóculo

intraperitoneal da bactéria em conjunto com um agente potencializador (Onderdonk *et al.*, 1979), sendo o mais comumente utilizado o CCE. Quando animais são desafiados com o inóculo composto pela bactéria e pelo CCE, há uma intensa produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos residentes e células mesoteliais no sítio da infecção, dentre as quais destaca-se a IL-1 β (Gibson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006; Alhawi *et al.*, 2009). Essa potente citocina pro-inflamatória pode atuar em inflamações locais ou sistêmicas, e regular diversas funções diferentes em todo o organismo (Johnston, Rahman e Mcfadden, 2007).

Através da utilização desse modelo de indução de peritonite, resultados prévios do nosso grupo mostraram que animais deficientes no receptor da IL-1, inoculados com *B. fragilis* e CCE, apresentaram uma atenuação da perda de peso, bem como uma drástica redução no *score* de abscessos intra-abdominais quando comparados a animais WT (Castelpoggi J.P. *et al.*, Tese de Doutorado, IBCCF, 2016; manuscrito em preparação). Apesar de apresentarem menos abscessos, a ausência da sinalização pelo receptor da IL-1 β não impactou na disseminação da bactéria nem na resistência a infecção, parâmetros avaliados em até 120 dias após a infecção. Além disso, nosso grupo também mostrou que o CCE isoladamente, mas não a bactéria sozinha, é capaz de ativar o inflamossomo e levar à secreção de IL-1 β madura em macrófagos e células dendríticas (*in vitro*), assim como no lavado peritoneal (*in vivo*).

Com esses resultados, vimos a importância da IL-1 β no nosso modelo e, apesar de termos caracterizado o CCE como o responsável por essa produção, a identificação do inflamossomo envolvido nessa resposta e seu papel no desenvolvimento da peritonite era uma questão em aberto. Nosso primeiro resultado mostrou que macrófagos e células dendríticas murinas deficientes nos componentes do inflamossomo NLRP3, ASC ou caspase-1, não produzem IL-1 β em resposta ao CCE, embora os níveis da citocina TNF- α permaneçam inalterados. A quantificação de TNF- α é um método que nós utilizamos para mostrar que o primeiro sinal da ativação do inflamossomo que leva à produção de pro-IL-1 β não está sendo afetado, já que o TNF- α é uma citocina cuja produção é dependente de NF- κ B, mas não requer processamento pela caspase-1. Estes dados apontam o inflamossomo NLRP3 como o responsável pela secreção de IL-1 β em resposta ao CCE *in vitro*. Além disso, observamos que macrófagos deficientes no receptor da IL-1 apresentam uma redução significativa nos níveis de IL-1 β no sobrenadante quando comparados às células WT, mostrando que essa citocina é capaz de amplificar sua resposta através de uma sinalização autócrina ou parácrina nas células, sugerindo que a IL-1 β se liga a seu receptor, aumentando sua própria

produção. Seo e colaboradores (2015) mostraram que macrófagos de medula óssea estimulados com conteúdo fecal fresco produzem IL-1 β de forma dependente de NLRP3 e caspase-1 (Seo *et al.*, 2015). No entanto, neste trabalho os autores creditam a produção desta citocina a bactéria simbiote do TGI *Proteus mirabilis*. No nosso trabalho, descartamos esta hipótese já que o CCE é autoclavado, descartando a possibilidade da presença de bactérias viáveis.

A ativação do inflamossomo NLRP3 pode se dar por duas vias: a **via canônica**, que leva diretamente a oligomerização do complexo, ativação de caspase-1 e processamento de pro-IL-1 e pro-IL-18, com a consequente produção das citocinas maduras; e a **via não canônica**, que envolve a participação de outra caspase inflamatória, a caspase-11 (caspase-4 em humanos) (Kayagaki *et al.*, 2011). Nos últimos anos, diversos autores vêm mostrando que bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Burkholderia thailandensis* ativam a via de sinalização mediada por caspase-11, levando ao processamento de IL-1 β e morte celular por piroptose (Kayagaki *et al.*, 2011; Broz *et al.*, 2012; Rathinam *et al.*, 2012; Kayagaki *et al.*, 2015; Stowe, Lee & Kayagaki, 2015). Kayagaki e colaboradores (2015) mostraram que a caspase-11 cliva a gasdermina-D resultando em dois fragmentos, sendo um desses um fragmento amino terminal que promove a piroptose e leva a ativação de NLRP3 induzindo o processamento da IL-1 β através da atividade proteolítica de caspase-1 (Kayagaki *et al.*, 2015). Para avaliar se a via não canônica está envolvida na produção de IL-1 β induzida por CCE, estimulamos macrófagos deficientes exclusivamente em caspase-11 e vimos que não houve diferença na produção de IL-1 β , quando comparados a macrófagos WT, confirmando o envolvimento da via canônica, independente de caspase-11, nessa resposta. Esses resultados também foram obtidos por Kayagaki e colaboradores, onde macrófagos deficientes em caspase-11 primados com LPS e estimulados com ATP ou cristais de ácido úrico não apresentam diferença na produção de IL-1 β quando comparados a macrófagos WT (Kayagaki *et al.*, 2011).

Bem como observado para animais deficientes em IL-1R (Castelpoggi J.P. *et al.*, Tese de Doutorado, IBCCF, 2016; manuscrito em preparação), a ausência de NLRP3, ASC e caspase-1 também protegeu camundongos do desenvolvimento da peritonite induzida por *B. fragilis* e CCE, já que estes apresentam uma atenuação na perda de peso e um menor *score* de abscessos intra-abdominais. Uma vez que os experimentos *in vitro* com as células deficientes para o inflamossomo NLRP3 mostram a importância deste para a secreção de IL-1 β induzida por CCE, nossos resultados até o momento sustentam a hipótese de que o CCE ativa o inflamossomo NLRP3 em macrófagos

e células dendríticas residentes no peritônio, induzindo à produção de IL-1 β e contribuindo para a resposta inflamatória que caracteriza a peritonite.

O inflamossomo NLRP3 é ativado por uma ampla variedade de PAMPs, como toxinas bacterianas formadoras de poros, e DAMPs, como ATP e cristais de ácido úrico, bem como por compostos particulados provenientes do ambiente como sílica e asbestos (Dostert *et al.*, 2008; Franchi, Muñoz-Planillo e Núñez, 2012; Koizumi *et al.*, 2012). Diversos mecanismos celulares têm sido descritos como sinais que levam a ativação de NLRP3, embora nenhum agonista tenha sido descrito até o momento. Destes sinais destaca-se a alteração dos níveis de potássio intracelular mediada por altas concentrações de ATP extracelular, que vai levar à saída desse íon da célula através de canais presentes na membrana, alterando o conteúdo iônico intracelular (Perregaux e Gabel, 1994). O ATP extracelular é proveniente de diversas fontes como células necróticas e apoptóticas, células endoteliais ou inflamatórias ativadas (Eltzschig, Sitkovsky e Robson, 2012), e é um dos ativadores de NLRP3 mais bem descritos na literatura. Para estudar a importância da liberação de ATP por células estimuladas com CCE na ativação de NLRP3, utilizamos macrófagos e células dendríticas deficientes no principal receptor purinérgico para ATP extracelular, o P2X₇. Observamos que essas células estimuladas com CCE ou com alum apresentam uma diminuição parcial da produção de IL-1 β , porém os níveis de TNF- α se mantiveram semelhantes. O papel do receptor P2X₇ no nosso modelo é parcialmente importante para a produção de IL-1 β induzida por CCE, diferente do que Iyer e colaboradores viram para macrófagos estimulados com sílica, já que macrófagos P2X₇^{-/-} apresentaram níveis semelhantes de IL-1 β quando comparado a células WT (Iyer *et al.*, 2009). Apesar dessa dependência parcial do P2X₇ *in vitro*, quando avaliamos o papel desse mesmo receptor *in vivo*, vimos que essa sinalização não foi essencial para o desenvolvimento de peritonite, pois animais deficientes em P2X₇ apresentam perda de peso e presença de abscessos abdominais de forma semelhante a animais WT. Isso mostrou que o requerimento parcial observado em experimentos *in vitro* se mostrou dispensável *in vivo*, já que nessas situações o quadro é mais complexo e conta com a participação de outros mecanismos e vias de sinalização atuando na resposta que fomenta a formação dos abscessos.

Apesar de não depender totalmente de ATP, a secreção de IL-1 β induzida por CCE foi completamente abolida por altas concentrações de potássio extracelular, que bloqueiam seu efluxo da célula. O efluxo de potássio tem se destacado como um mecanismo de ativação do inflamossomo NLRP3 e a primeira evidência desse mecanismo foi observada quando ionóforos de potássio, como

a nigericina, levaram a maturação de IL-1 β em macrófagos murinos estimulados com LPS (Perregaux e Gabel, 1994; Muñoz-Planillo *et al.*, 2013). A partir daí diversos outros estudos mostraram que altas concentrações extracelulares de potássio bloqueiam a ativação de NLRP3 em macrófagos primados com LPS e estimulados com cristais de ácido úrico, nigericina ou ATP (Franchi *et al.*, 2007; Muñoz-Planillo *et al.*, 2013), assim como visto no nosso modelo.

Além do efluxo de potássio, a desestabilização lisossomal causada por fagocitose de moléculas particuladas, um processo conhecido como fagocitose frustrada (Halle *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008) e dano mitocondrial levando à geração de ROS (Heid *et al.*, 2013) são mecanismos também determinantes para a ativação do inflamossomo NLRP3. Após estabelecer a dependência parcial da via ATP/P2X₇ e a dependência total do efluxo de potássio na produção de IL-1 β induzida por CCE, avaliamos se outros mecanismos estariam participando desta resposta. Utilizando macrófagos derivados de medula, vimos que a fagocitose, provavelmente de componentes particulados, com subsequente liberação de catepsinas lisossomais e geração de ROS mitocondrial são processos essenciais para a produção de IL-1 β em resposta ao CCE, uma vez que inibidores dessas vias (citocalasina-D, CA-074-Me e MitoTEMPO, respectivamente) bloquearam essa secreção. De forma similar, Hornung e colaboradores mostraram que citocalasina-D e CA-074-Me abolem a produção de IL-1 β por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimuladas com cristais de ácido úrico e sílica (Hornung *et al.*, 2008). Finalmente, a utilização do inibidor de ROS mitocondrial mitoTEMPO também levou à inibição da secreção de IL-1 β induzida por CCE. Quando a célula sofre dano na mitocôndria, há geração de ROS mitocondrial e isso leva a ativação do inflamossomo NLRP3 em resposta a cristais de ácido úrico, que é um componente particulado (Zhou *et al.*, 2011). Isso corrobora os nossos dados, já que quando inibimos a geração de ROS, há inibição da produção de IL-1 β em resposta ao CCE, que possui em sua composição componentes particulados. Juntos, esses dados nos levam a pensar que a fagocitose de algum componente particulado presente no CCE por macrófagos e células dendríticas leva a ativação do inflamossomo NLRP3 e consequente produção de IL-1 β . De fato, quando utilizamos apenas o SN do CCE não observamos a produção de IL-1 β por células dendríticas diferente do que observamos para o CCE íntegro.

O CCE é composto por componentes da microbiota e da dieta, como os carboidratos não digeríveis presentes na forma de fibras. Neste trabalho, nós avaliamos se o teor de fibra presente na dieta de animais que são utilizados como fontes de CCE seria importante para ativação do

inflamossomo e produção de IL-1 β . Quando estimulamos macrófagos e células dendríticas com o CCE ausente de fibra dietética, vimos uma diminuição significativa da produção de IL-1 β , enquanto que o uso de CCE com alto teor de fibra promove um aumento da produção desta citocina, quando comparados ao CCE controle. Além disso, esse aumento da produção de IL-1 β é completamente dependente do inflamossomo NLRP3. Estes dados foram confirmados utilizando fibra dietética purificada, que se mostrou capaz de ativar caspase-1 e levar a secreção de IL-1 β em células primadas com LPS de forma dependente de NLRP3. Isso corrobora com dados da literatura que mostram que moléculas particuladas, como sílica, cristais de ácido úrico, cristais de colesterol e alum ativam o inflamossomo NLRP3 e levam a produção de IL-1 β (Franchi e Núñez, 2008; Kono e Rock, 2008; Schroder e Tschopp, 2010; Franchi, Munoz-Planillo e Nunez, 2012; Henao-Mejia *et al.*, 2012). Apesar de aumentar a quantidade de IL-1 β produzida, nossos dados indicam que maiores concentrações de fibra não interferem na indução do primeiro sinal, visto que os níveis de TNF- α se mantem semelhantes. Isto mostra que o fator limitante no CCE para a ativação de NLRP3 e produção de IL-1 β é a presença e a concentração de material particulado, no caso a fibra. O primeiro sinal é, provavelmente, disparado pelo reconhecimento de agonistas de receptores TLR provenientes da microbiota, fator este que não é alterado pela modulação do teor de fibra na dieta, embora isso não tenha sido investigado nesse trabalho.

Tendo observado que a quantidade de fibra presente no CCE é um fator determinante para a produção de IL-1 β *in vitro*, avaliamos se isto também tem relação com o agravamento da peritonite *in vivo*. Animais inoculados com *B. fragilis* e CCE ausente de fibras apresentam atenuação da perda de peso e menor *score* de abscessos, ao passo que animais inoculados com a mesma bactéria, mas na presença do CCE contendo alto teor de fibra, apresentam um agravamento do quadro clínico, ambos quando comparados a animais inoculados com *B. fragilis* e CCE controle. Os dados obtidos nesse experimento sustentam a nossa hipótese de que a fibra presente no TGI, quando extravasa para a cavidade peritoneal, ativa o inflamossomo NLRP3 levando a consequente produção de IL-1 β , que contribui para o desenvolvimento da peritonite. Corroborando com nossos dados, Giguère e colaboradores mostraram que o inóculo ip. de LPS em combinação com alum compõe um modelo de peritonite estéril dependente do inflamossomo NLRP3 (Giguère *et al.*, 2014).

A ativação de caspases como a caspase-1, mas principalmente a caspase-11, pode induzir um tipo de morte celular inflamatória chamada piroptose onde, em paralelo a produção de IL-1 β ,

ocorre a perda da integridade da membrana celular com consequente liberação de componentes intracelulares, dentre eles a enzima lactato desidrogenase (LDH) (Miao, Rajan e Aderem, 2011). Observamos que o CCE é capaz de induzir LDH no sobrenadante de macrófagos, e este efeito foi independente de NLRP3. Este dado é corroborado por Jin e colaboradores, que observaram que macrófagos primados com LPS e estimulados com hidroxapatita e alum (ambos moléculas particuladas) também induzem a liberação de LDH de forma independente de NLRP3 (Jin *et al.*, 2011). Este processo de morte é mediado, geralmente, por caspase-11, embora a caspase-1 também seja capaz de levar a piroptose. O envolvimento destas caspases na piroptose induzida por CCE ainda está sendo investigada pelo nosso grupo.

Assim, nossos resultados indicam que a fibra proveniente da dieta, uma vez fagocitada por macrófagos (e possivelmente por células dendríticas) é capaz de ativar o inflamossomo NLRP3, levando a produção da citocina IL-1 β , que sabidamente é um importante mediador da resposta inflamatória que caracteriza o quadro de peritonite. A inibição da sinalização da IL-1, bem como a ausência de NLRP3 ou a privação de fibra na dieta atenuam a doença, sugerindo que um tratamento possível para a peritonite seria a inibição da IL-1 ou das vias que levam a sua produção. No entanto, o impacto disso para o controle da infecção, com possível disseminação de microrganismos e evolução para sepse ainda precisa ser melhor investigado. Com isso, haveria redução significativa das respostas inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento dos abscessos abdominais e do quadro clínico, que são fatores comumente relacionados à morbidade e mortalidade em pacientes.

7. CONCLUSÃO

Até o momento, nossos resultados sugerem que o inflamossomo envolvido na peritonite induzida por *B. fragilis* e CCE é o inflamossomo NLRP3, sendo este responsável também pela produção de IL-1 β induzida por CCE, embora a participação de outros inflamossomos não tenha sido explorada, logo não pode ser descartada. Além disso, nossos resultados nos levam a crer que não há dependência do receptor P2X₇ para a secreção de IL-1 β *in vitro* ou para o desenvolvimento de peritonite. Por outro lado, observamos que a produção de IL-1 β induzida por CCE é dependente de mecanismos como a fagocitose, catepsina B lisossomal, geração de ROS mitocondrial e efluxo de potássio. Essa produção também é dependente de produtos particulados presentes no CCE, aqui identificados como os carboidratos não digeríveis provenientes da alimentação, abundantes no TGI

na forma de fibras. Finalmente, descrevemos que a quantidade de fibra na dieta é diretamente proporcional a produção de IL-1 β através da ativação do inflamossomo NLRP3, e que isto contribui significativamente para o agravamento da peritonite. Concluimos este trabalho propondo que a fibra se comporte como um sinal de perigo fora do intestino, cuja presença indica a quebra de barreira intestinal e descompartimentalização da microbiota, sinalizando a necessidade de uma resposta inflamatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (2010) **Biologia molecular da célula**. 5ª edição, Porto Alegre, Brasil. Ed. Artmed
- ALDRIDGE, K. E. (1995) **The occurrence, virulence, and antimicrobial resistance of anaerobes in polymicrobial infections**. The American Journal of Surgery. 169, 2S-7S
- ALHAWI, M., STEWART, J., ERRIDGE, C., PATRICK, S., POXTON, I. R. (2009) **Bacteroides fragilis signals through Toll-like receptor (TLR) 2 and not through TLR4**. Journal of Medical Microbiology. 58, 1015-1022
- BERGSBAKEN, T., FINK, S. L., COOKSON, B. T. (2009) **Pyroptosis: host cell death and inflammation**. Nature Review Microbiology. 7, 99-109
- BOYDEN, E. D., DIETRICH, W. F. (2006) **Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin**. Nature Genetics. 38, 240-244
- BROOK, I. (2008). **Infective Endocarditis caused by anaerobic bacteria**, Archives of Cardiovascular Diseases. Dis. 101, 665-676
- BROZ, P., RUBY, T., BELHOCINE, K., BOULEY, D. M., KAYAGAKI, N., DIXIT, V. M., MONACK, D. M. (2012) **Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1**. Nature. 490, 288-291
- CARNEIRO, B. G. M. C, PETROIANU, A, RODRIGUES, F. H. O. C., ROCHA, R. F. (2002) **Estudo comparativo entre diversos tipos de tratamento para peritonite fecal em rato**. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. 29, 43-48
- Castelpoggi, J. P. Estudo da participação da IL-1 β e dos inflamossomos em modelo de peritonite induzida pela bactéria comensal *Bacteroides fragilis*: UFRJ. 2016. Dissertação (Doutorado em: Ciências Biológicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016
- CHAMBERS, F. G., KOSHY, S.S., SAIDI, R. F., CLARK, D.P., MOORE, R.D., SEARS, C. L. (1997) **Bacteroides fragilis toxin exhibits polar activity on monolayers of human intestinal epithelial cells (T84 cells) in vitro**. Infection and Immunity. 65, 3561–3570
- CHOW, J., LEE, M. S., SHEN, Y., KHOSRAVI, A., MAZMANIAN, S. K. (2010). **Host-Bacterial Symbiosis in Health and Disease**. Advances in Immunology, 107, 243-274
- COHEN-PORADOSU, R., MCLOUGHLIN, R. M., LEE, J. C., KASPER, D. L. (2011) **Bacteroides fragilis-stimulated interleukin-10 contains expanding disease**. Journal of Infection Diseases. 204, 363-371
- DAVIS, B. K., WEN, H., TING, J. P. (2011) **The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases**. Annual Review of Immunology. 29, 707-735
- DINARELLO, C. A. (1998) **Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme**. Annals of the New York Academy of Sciences. 856, 1-11
- DOSTERT, C., PÉTRILLI, V., VAN BRUGGEN, R., STEELE, C., MOSSMAN, B. T., TSCHOPP, J. (2008) **Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica**. Science. 320, 674-677
- DUAN, J., AVCI, F. Y., KASPER, D. L. (2008) **Microbial carbohydrate depolymerization by antigen-presenting cells: deamination prior to presentation by the MHCII pathway**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 5183-5188
- EISENBARTH, S. C., COLEGIO, O. R., O'CONNOR Jr., W., SUTTERWALLA, F. S., FLAVELL, R. A. (2008) **Crucial role for the NLRP3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants**. Nature. 453, 1122-1126
- ELINAV, E., HENAO-MEJIA, J., FLAVELL, R. A. (2012) **Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses**. Mucosal Immunology. 6, 4-13
- ELTZSCHIG, H. K., SITKOVSKY, M. V., ROBSON, S. C. (2012) **Purinergic signaling during inflammation**. The New England Journal of Medicine. 367, 2322-2333

- FINLAY, B. B., FALKOW, S. (1997). **Common themes in microbial pathogenicity revisited.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 61, 136-169
- FINLAY-JONES, J. J., DAVIES, K. V., STURM, L. P., KENNY, P. A., HART, P. H. (1999) **Inflammatory processes in a murine model of intra-abdominal abscess formation.** *Journal Leukocyte Biology.* 66, 583-587
- FINLAY-JONES, J. J., KENNY, P. A., NULSEN, M. F., SPENCER, L. K., HILL, N. L., MCDONALD, P. J. (1991) **Pathogenesis of intraabdominal abscess formation: abscess-potentiating agents and inhibition of complement-dependent opsonization of abscess-inducing bacteria.** *Journal of Infect Diseases.* 164, 1173-1179
- FRANCHI, L., AMER, A., BODY-MALAPEL, M., KANNEGANTI, T. D., OZÖREN, N., JAGIRDAR, R., INOHARA, N., VANDENABEELE, P., BERTIN, J., COYLE, A., GRANT, E. P., NÚÑEZ, G. (2006) **Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages.** *Nature Immunology.* 7, 576-582
- FRANCHI, L., KANNEGANTI, T. D., DUBYAK, G. R., NÚÑEZ, G. (2007) **Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria.** *Journal of Biological Chemistry.* 282, 18810–18818
- FRANCHI, L., MUNOZ-PLANILLO, R., NUNEZ, G. (2012) **Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes.** *Nature Immunology.* 13, 325-332
- FRANCHI, L., NUNEZ, G. (2008) **The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity.** *European Journal of Immunology.* 38, 2085-2089
- GARCIA-SANCHEZ, J. E., GARCIA-GARCIA, M. I., GARCIA-GARROTE, F., SANCHEZ-ROMERO, I. (2013) **Microbiological diagnosis of intra-abdominal infections.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 31, 230-239
- GARLANDA, C., DINARELLO, C. A., MANTOVANI, A. (2013) **The interleukin-1 family: back to the future.** *Immunity.* 39, 1003-1018
- GIAMARELLOU, H. (2000). **Anaerobic infection therapy.** *International Journal of Antimicrobial Agents.* 16, 341-346
- GIBSON, F. C., 3RD, ONDERDONK, A. B., KASPER, D. L. TZIANABOS, A. O. (1998) **Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*.** *The Journal of Immunology.* 160, 5000-5006
- GIBSON, F. C., 3RD, TZIANABOS, A. O., ONDERDONK, A. B. (1996) **The capsular polysaccharide complex of *Bacteroides fragilis* induces cytokine production from human and murine phagocytic cells.** *Infection and Immunity.* 64, 1065-1069
- GIGUÈRE, P. M., GALL, B. J., EZEKWE JR., E. A. D., LAROCHE, G., BUCKLEY, B. K., KEBAIER, C., WILSON, J. E., TING, J. P., SIDEROVSKI, D. P., DUNCAN, J. A. (2014) **G Protein Signaling Modulator-3 Inhibits the Inflammasome Activity of NLRP3.** *Journal of Biological Chemistry.* 289, 33245-33257
- GOMBAULT, A., BARON, L., COUILLIN, I. (2012) **ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation.** *Frontiers in Immunology.* 3, 414
- GRIFFITHS, R. J., STAM, E. J., DOWNS, J. T., OTTERNESS, I. G. (1995) **ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells *in vivo*.** *The Journal of Immunology.* 154, 2821-2828
- GRIVENNIKOV, S. I, WANG, K., MUCIDA, D., STEWART, C. A., SCHNABL, B., JAUCH, D., TANIGUCHI, K., YU, G. Y., OSTERREICHER, C. H., HUNG, K. E., DATZ, C., FENG, Y., FEARON, E. R., OUKKA, M., TESSAROLLO, L., COPPOLA, V., YAROVINSKY, F., CHEROUTRE, H., ECKMANN, L., TRINCHIERI, G., KARIN, M. (2012) **Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth.** *Nature.* 491, 254–258
- HALLE, A., HORNING, V., PETZOLD, G. C., STEWART, C. R., MONKS, B. G., REINHECKEL, T., FITZGERALD, K. A., LATZ, E., MOORE, K. J., GOLENBOCK, D. T. (2008) **The NLRP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β .** *Nature Immunology.* 8, 857-865
- HANDY, D. E., LOSCALZO, J. (2012) **Redox regulation of mitochondrial function.** *Antioxidants & Redox Signaling.* 16, 1323-1367

- HEID, M. E., KEYEL, P. A., KAMGA, C., SHIVA, S., WATKINS, S. C., SALTER, R. D. (2013) **Mitochondrial ROS induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation.** *The Journal of Immunology.* 191, 5230-5238
- HENAO-MEJIA, J., ELINAV, E., STROWIG, T., FLAVELL, R.A. (2012) **Inflammasomes: far beyond inflammation.** *Nature Immunology.* 13, 321-324
- HOOPER, L. V., STAPPENBECK, C. V., GORDON, J. I. (2003). **Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity.** *Nature Immunology.* 4, 269-273
- HORNUNG, V., BAUERNFEIND, F., HALLE, A., SAMSTAD, E. O., KONO, H., ROCK, K. L., FITZGERALD, K. A., LATZ, E. (2008) **Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization.** *Nature Immunology.* 9, 847-856
- IYER, S. S., PULSKENS, W. P., SADLER, J. J., BUTTER, L. M., TESKE, G. J., ULLAND, T. K., EISENBARTH, S. C., FLORQUIN, S., FLAVELL, R. A., LEEMANS, J. C., SUTTERWALA, F. S. (2009) **Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome.** *Proceedings of the National Academy of Science.* 106, 20388-20393
- JIN, C., FRAYSSINER, P., PELKER, R., CWIRKA, D., HU, B., VIGNERY, A., EISENBARTH, S. C., FLAVELL, R. A. (2011) **NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy.** *Proceedings of the National Academy of Science.* 108, 14867-14872
- JO, E., KIM, J. K., SHIN, D., SASAKAWA, C. (2016) **Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation.** *Cellular & Molecular Immunology.* 13, 148-159
- JOHNSTON, J. B., RAHMAN, M. M., MCFADDEN, G. (2007) **Strategies that modulate inflammasomes: insights from host-pathogen interactions.** *Seminars in Immunopathology.* 29, 261-274
- JOUSIMIES-SOMER, H., SUMMANEN, P., CITRON, D. M., BARON, E. J., WEXLER, H. M., FINEGOLD, S. M. (2002) **Wadsworth Anaerobes Bacteriology Manual.** Star Publishing Company. 6, 39-63
- KALKA-MOLL, W. M., WANG, Y., COMSTOCK, L. E., GONZALEZ, S. E., TZIANABOS, A. O., KASPER, D. L. (2001) **Immunochemical and biological characterization of three capsular polysaccharides from a single *Bacteroides fragilis* strain.** *Infection and Immunity.* 69, 2339-2344
- KAYAGAKI, N., WARMING, S., LAMKANFI, M., VANDE WALLE, L., LOUIE, S., DONG, J., NEWTON, K., QU, Y., LIU, J., HELDENS, S., ZHANG, J., LEE, W. P., ROOSE-GIRMA, M., DIXIT, V. M. (2011) **Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11.** *Nature.* 479, 117-121
- KAYAGAKI, N., STOWE, I. B., LEE, B. L., O'ROURKE, K., ANDERSON, K., WARMING, S., CUELLAR, T., HALEY, B., ROOSE-GIRMA, M., PHUNG, Q. T., LIU, P. S., LILL, J. R., LI, H., WU, J., KUMMERFELD, S., ZHANG, J., LEE, W. P., SNIPAS, S. J., SALVESEN, G. S., MORRIS, L. X., FITZGERALD, L., ZHANG, Y., BERTRAM, E. M., GOODNOW, C. C., DIXIT, V. M. (2015) **Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling.** *Nature.* 526, 666-671
- KOIZUMI, Y., TOMA, C., HIGA, N., NOHARA, T., NAKASONE, N., SUZIKI, T. (2012) **Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection.** *Cellular Microbiology.* 14, 149-154
- KONO, H., ROCK, K. L. (2008) **How dying cells alert the immune system to danger.** *Nature Reviews Immunology.* 8, 279-289
- KOOL, M., PÉTRILLI, V., DE SMEDT, T., ROLAZ, A., HAMMAD, H., VAN NIMWEGEN, M., BERGEN, I. M., CASTILLO, R., LAMBRECHT, B. N., TSCHOPP, J. (2008) **Cutting edge: Alum adjuvante stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NLRP3 inflammasome.** *The Journal of Immunology.* 181, 3755-3759
- KRINOS, C. M., COYNE, M. J., WEINACHT, K. G., TZIANABOS, A. O., KASPER, D. L., COMSTOCK, L. E. (2001). **Extensive surface diversity of commensal microorganism by multiple DNA inversions.** *Nature,* 414, 555-558
- LEVISON, M. E., BUSH, L. M. (1990) **Peritonitis and other intra-abdominal infections.** *Principles and practice of infectious diseases.* 3, 705-740

- LI, H., NOOKALA, S., RE, F. (2007) **Aluminum hidroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release.** The Journal of Immunology. 178, 5271-5276
- LOBO, L. A., BENJAMIM, C. F., OLIVEIRA, A. C. (2016) **The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis.** Clinical & Translational Immunology. 5
- LOBO, L. A., JENKINS, A. L., JEFFREY, S. C., ROCHA, E. R. (2013). **Expression of *Bacteroides fragilis* hemolysins *in vivo* and role of HlyBA in an intra-abdominal infection model.** Microbiology open, 2, 326-327
- MALANGONI, M. A., INUI, T. (2006) **Peritonitis - the Western experience.** World Journal of Emergency Surgery, 1, 25
- MALDONADO, R. F., SÁ-CORREIA, I., VALVANO M. A. (2016) **Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection.** FEMS Microbiology Reviews.
- MARTINON, F., BURNS, K., TSCHOPP, J. (2002) **The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.** Molecular Cell. 10, 417-426
- MARTIONON, F., BURNS, K., TSCHOPP, J. (2002) **The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.** Molecular Cell. 417-426
- MASŁOWSKI, K. M., MACKAY, C. R. (2011) **Diet, gut microbiota and immune responses.** Nature Immunology. 12, 5-9
- MAZMANIAN, S. K., LIU, C. H., TZIANABOS A. O., KASPER, D. L. (2005) **An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system.** Cell. 122, 107-118
- MAZMANIAN, S. K., KASPER, D. L. (2006) **The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system.** Nature Reviews Immunology. 6, 849-858
- MAZMANIAN, S. K., ROUND, J. L., KASPER, D. L. (2008) **A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease.** Nature. 453, 620-625
- MESQUITA JR., D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T., DE SOUZA, A. W. S., DA SILVA, N. P., ANDRADE, L. E. C., CRUVINEL, W. M. (2008) **Aspectos celulares e moleculares da inflamação.** Sinopse da Reumatologia. 3, 66-81
- MIAO, E. A., RAJAN, J. V., ADEREM, A. (2011) **Caspase-1-induced pyroptotic cell death.** Immunology Reviews. 243, 206-214
- MUÑOZ-PLANILLO, R., KUFFA, P., MARTÍNEZ-COLÓN, G., SMITH, B. L., RAJENDIRAN, T. M., NÚÑEZ, G. (2013) **K⁺ efflux is the Common Trigger of NLRP3 inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter.** Immunity. 38, 1142-1153
- NADATANI, Y., HUO, X., ZHANG, X., YU, C., CHENG, E., ZHANG, Q., DUNBAR, K. B., THEISS, A., PHAM, T. H., WANG, D. H., WATANABE, T., FUJIWARA, Y., ARAKAWA, T., SPECHLER, S. J., SOUZA, R. F. (2016) **NOD-like receptor protein 3 inflammasome priming and activation in Barrett's epithelial cells.** Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. 2, 439-453
- NDAMUKONG, I. C., GEE, J., SMITH, C. J. (2013). **The extracytoplasmic function sigma factor EcfO protects *Bacteroides fragilis* against oxidative stress.** Journal of Bacteriology. 195, 145-155
- NULSEN, M. F., FINLAY-JONES, J. J., SKINNER, J. M., MCDONALD, P. J. (1983) **Intra-abdominal abscess formation in mice: quantitative studies on bacteria and abscess-potentiating agents.** British Journal of Experimental Pathology. 64, 345-353
- OBISO JR., R. J., LYERLY, D. M., VAN TASSELL, R. L., WILKINS, T. D. (1995) **Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage *in vivo*.** Infection and Immunity. 63, 3820-3826
- ONDERDONK, A. B., KASPER, D. L., MANSHEIM, B. J., LOUIE, T. J., GORBACH, S. L., BARTLETT, J. G. (1979) **Experimental animal models for anaerobic infections.** Reviews Infectious Diseases. 1, 291-301
- PARK, J. H., JEONG, S. Y., CHOI, A. J., KIM, S. J. (2015) **Lipopolysaccharide directly stimulates Th17 differentiation *in vitro* modulating phosphorylation of RelB and NF-kappaB1.** Immunology Letters. 165, 10-19

- PAUER, H., CAVALCANTI, S. N., TEIXEIRA, F. L., SANTOS-FILHO, J., VOMMARO, R. C., OLIVEIRA, A. C., FERREIRA, E. O., DOMINGUES, R. R. (2013). **Inactivation of a fibronectin-binding TonB-dependent protein adhesion properties of *Bacteroides fragilis***. *Journal Medical Microbiology*. 62, 1524-1530
- PERREGAUX, D., GABEL, C.A. (1994) **Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity**. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 15195–15203
- PETRILLI, V., PAPIN, S., DOSTERT, C., MAYOR, A., MARTINON, F., TSCHOPP, J. (2007) **Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration**. *Cell Death & Differentiation*. 14, 1583-1589
- POLK, B. F., KASPER, D. L. (1977) ***Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates**. *Annals of Internal Medicine*. 86, 569–571.
- PRIVITERA, G., SEBALD, M., FAYOLLE, F. (1979) **Common regulatory mechanism of expression and conjugative ability of a tetracycline resistance plasmid in *Bacteroides fragilis***. *Nature*, 278, 657-659
- PUMBWE, L., SKILBECK, C. A., WEXLER, H. M. (2006) **The *Bacteroides fragilis* cell envelope: quarterback, linebacker, coach-or all three?** *Anaerobe*. 12, 211-220
- RABIZADEH, S., RHEE, K. J., WU, S., HUSO, D., GAN, C. M., GOLUB J. E., WU, X., ZHANG, M., SEARS C. L. (2007) **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis**. *Inflammatory Bowel Diseases*. 13, 1475–1483
- RHEE, K. J., WU, S., WU, X., HUSO, D. L., KARIM, B., FRANCO, A. A., RABIZADEH, S., GOLUB J. E., MATHEWS, L. E., SHIN, J., SARTOR, R. B., GOLENBOCK, D., HAMAD, A. R., GAN, C. M., HOUSSEAU, F., SEARS C. L. (2009) **Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice**. *Infection and Immunity*. 77, 1708–1718
- RITEAU, N., GOMBAULT, A., COUILLIN, I. (2016) **Assessment of inflammasome activation by cytokine and danger signal detection**. *Methods in Molecular Biology*. 1417, 63-74
- RODRIGUES, F. H., CARNEIRO, B. G., ROCHA, R. F., PETROIANU, A. (2005) **Inhibition of abdominal abscess formation in rat: Mortality by sepsis**. *Arquivos de Gastroenterologia*., 42, 50-54
- ROUND, J. L., LEE, S. M., LI, J., TRAN, G., JABRI, B., CHTILA, T. A., MAZMANIAN, A. K. (2011) **The toll-like receptor pathway establishes commensal gut colonization**. *Science*. 332, 974-977
- ROUND, J. L., MAZMANIAN, S. K. (2010) **Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota**. *Proceedings of the National Academy of Science*. 107, 12204-12209
- SARTELLI, M., CATENA, F., COCCOLINI, F., PINNA, A. D. (2012) **Antimicrobial management of intra-abdominal infections: literature's guidelines**. *World Journal of Gastroenterology*, 18, 865-871
- SAWYER, R.G., CLARIDGE, J.A., NATHENS, A.B., ROTSTEIN, O.D., DUANE, T.M., EVANS, H.L., COOK, C.H., O'NEILL, P.J., MAZUSKI, J.E., ASKARI, R., WILSON, M.A., NAPOLITANO, L.M., NAMIAS, N., MILLER, P.R., DELLINGER, E.P., WATSON, C.M., COIMBRA, R., DENT, D.L., LOWRY, S.F., COCANOUR, C.S., WEST, M.A., BANTON, K.L., CHEADLE, W.G., LIPSETT, P.A., GUIDRY, C.A., POPOVSKY, K. (2015) **Trial of short-course antimicrobial therapy for intraabdominal infection**. *The New England Journal of Medicine*, 372, 1996-2005
- SCHRODER, K., TSCHOPP, J. (2010) **The inflammasomes**. *Cell*. 140, 821-832
- SEARS, C. L., GEIS A. L., HOUSSEAU F. (2014) ***Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis**. *The Journal of Clinical Investigation*. 124, 4166-4172
- SEO, S. U., KAMADA, N., MUÑOZ-PLANILLO, R., KIM, Y. G., KIM, D., KOIZUMI, Y., HASEWAGA, M., HIMPSL, S. D., BROWNE, H. P., LAWLEY, T. D., MOBLEY, H. L. T., INOHARA, N., NÚÑEZ, G. (2015) **Distinct Commensals Induce Interleukin-1beta via NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Monocytes to Promote Intestinal Inflammation in Response to Injury**. *Immunity*. 42, 744-755

- SHAPIRO, M. E., KASPER, D. L., ZALEZNIK, D. F., SPRIGGS, S., ONDERDONK, A. B., FINBERG, R. W. (1986) **Cellular control of abscess formation: role of T cells in the regulation of abscesses formed in response to *Bacteroides fragilis***. *The Journal of Immunology*. 137, 341-346
- SHIMADA, K., CROTHER, T. R., KARLIN, J., DAGVADORJ, J., CHIBA, N., CHEN, S., RAMANUJAN, V. K., WOLF, A. J., VERGNES, L., OJCIUS, D. M., RENTSENDORJ, A., VARGAS, M., GUERRERO, C., WANG, Y., FITZGERALD, K. A., UNDERHILL, D. M., TOWN, T., ARDITI, M. (2012) **Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis**. *Immunity*. 36, 401-414
- SMITH, C. J., ROCHA, E. R., PASTER, B. J. (2006) **The Medically Important *Bacteroides* spp. in Health and Disease**. 381-427
- SMITH, D. E. (2011) **The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33**. *Journal of Leukocyte Biology*, 89, 383-392
- SOLLBERGER, G., STRITTMATTER, G. E., GARSTKIEWICZ, M., SAND, J., BEER, H. D. (2014) **Caspase-1: The inflammasome and beyond**. *Innate Immunity*. 20, 115-125
- STEHLIK, C., DORFLEUTNER, A. (2007) **COPs and POPs: modulators of inflammasome activity**. *The Journal of Immunology*. 179, 7993-7998
- SURANA, N. K., KASPER, D. L. (2012) **The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA**. *Immunological Reviews*. 245, 13-26
- TAN, J., MCKENZIE, C., POTAMITIS, M., THORBURN, A. N., MACKAY, C. R., MACIA, L. (2014) **The role of short-chain fatty acids in health and disease**. *Advances in Immunology*. 121, 91-119
- TROY, E. B., CAREY, V. J., KASPER, D. L., COMSTOCK, L. E. (2010). **Orientation of the *Bacteroides fragilis* Capsular Polysaccharide Biosynthesis Locus Promoter During Symbiosis and Infection**. *Journal of Bacteriology*, 192, 5832-5836
- TZIANABOS, A. O., KASPER, D. L. (2002) **Role of T cells in abscess formation**. *Current Opinion in Microbiology*. 5, 92-96
- VON MOLTKE, J., AYRES, J. S., KOFOED, E. M., CHAVARRÍA-SMITH, J., VANCE, R. E. (2013) **Recognition of bacteria by inflammasomes**. *Annual Review of Immunology*, 31, 73-106
- VYAS, U., RANGANATHAN, N. (2012) **Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond**. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, 1-16
- WALKER, A. P., CONDON, R. E. (1991) **Peritonite e abscessos intra-abdominais**. *Princípios de cirurgia*. 5, 1216-1242
- WANG, L., MAJI, G. A., GRENIER, J. M., AL-GARAWI, A., MERRIAM, S., LORA, J. M., GEDDES B. J., BRISKIN, M., DISTEFANO, P. S., BERTIN, J. (2002) **PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing**. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 29874-29880
- WANG, Q., MCLOUGHLIN, R. M., COBB, B. A., CHARREL-DENNIS, M., ZALESKI, K. J., GOLENBOCK, D., TZIANABOS, A. O., KASPER, D. L. (2006) **A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2**. *The Journal of Experimental Medicine*. 203, 2853-2863
- WELEDJI, E. P., NGOWE, M. N. (2013) **The challenge of intra-abdominal sepsis**. *International Journal of Surgery*, 11, 290-295
- WEXLER, H.M. (2007). ***Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty** *Clinical Microbiology Reviews*. 20, 593-621
- WHITFIELD C, TRENT MS. (2014) **Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides**. *Annual Review of Biochemistry*. 83, 99-128
- WILLIS, A. (1991). **Abdominal sepsis**. In: **Anaerobes in Human Diseases**, 197-223
- WU, S., LIM, K. C., HUANG, J., SAIDI, R. F., SEARS, C. L. (1998) ***Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 14979-14984

WU, S., RHEE, K. J., ZHANG, M., FRANCO, A., SEARS, C. L. (2007) ***Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage.** Journal of Cell Science. 120, 1944–1952

YANG, D., HE, Y., MUÑOZ-PLANILLO, R., LIU, Q., NÚÑEZ, G. (2015) **Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X₇ pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock.** Immunity. 43, 923-932

YARON, J. R., GANGARAJU, S., RAO, M. Y., KONG, X., ZHANG, L., SU, F., TIAN, Y., GLENN, H. L., MELDRUM, D. R. (2015) **K⁺ regulates Ca²⁺ to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells.** Cell Death and Diseases. 6.

ZALEZNIK, D. F., KASPER, D. L. (2001) **Intraabdominal infections and abscesses.** Harrison's principles of internal medicine. 15, 829-834

ZHOU, R., TARDIVEL, A., THORENS, B., CHOI, I., TSCHOPP, J. (2010) **Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation.** Nature Immunology. 11, 136-141

ZHOU, R., YAZDI, A. S., MENU, P., TSCHOPP, J. (2011) **A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation.** Nature. 469, 221-225