

RENATO DE MORAES RIBEIRO

ESTUDO DA FORMAÇÃO DE “AGGRESOME-LIKE  
INDUCED STRUCTURES” EM MACRÓFAGOS  
MURINOS INFECTADO POR *Listeria monocytogenes*



**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/2017

**Trabalho realizado no Instituto de Biofísica  
Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a  
orientação do Professor Leonardo Holanda  
Travassos Corrêa.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Renato de Moraes

Estudo da formação de “aggresome-like induced structures” em macrófagos murinos infectados por *Listeria monocytogenes* / Renato de Moraes Ribeiro. – Rio de Janeiro, 2017.

32 f.

Orientador: Leonardo Holanda Travassos Corrêa.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2017.

1. *Listeria monocytogenes* 2. agregação de proteínas 3. ALIS 4. autofagia I. Corrêa, Leonardo Holanda Travassos, orient. II. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

**RENATO DE MORAES RIBEIRO**

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE “AGGRESOME-LIKE INDUCED STRUCTURES” EM  
MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS POR *Listeria monocytogenes***

**Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2017**

---

**Profa. Dra. Raquel Regina Bonelli, IMPG, UFRJ**

---

**Profa. Dra. LÍlian de Oliveira Moreira, Faculdade de Farmácia, UFRJ**

---

**Prof. Dr. Heitor Affonso de Paula Neto, Faculdade de Farmácia, UFRJ**

---

**Prof. Dr. Leonardo Nimrichter, IMPG, UFRJ**

**Dedico este trabalho à minha avó  
Conceição, que descansa em paz.**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Cristovão Ribeiro e Heloisa Pereira, por permitirem que essa graduação aconteça. Por sempre me apoiarem e me incentivarem a fazer tudo o que eu quiser fazer.

Agradeço ao meu orientador, prof. Leonardo Travassos, por ter me aceitado como aluno de iniciação científica e por ter me orientado, sempre sendo paciente e solícito.

À Mariana Siqueira e ao Luiz Ricardo, por toda a ajuda no laboratório e por contribuir com o meu aprendizado.

Aos membros do laboratório: Bárbara, Stefany, Vicente, prof. Francisco, prof. Miriam e prof. André, por dividirem o ambiente de trabalho de forma harmoniosa e descontraída.

Aos meus amigos Fernanda Rei, Andressa Temperini, Isabella Campello, Thiago Silva, William Jefferson, Giovanna Bomgiovanni e Ingrid Araújo. Por todos os momentos que passamos juntos, sem vocês essa graduação teria sido muito mais difícil.

Aos professores que me deram aula ao longo da graduação, por contribuírem de forma significativa para a minha formação.

À Alexandra Elbakyan, criadora do sci-hub, por permitir o acesso livre a artigos científicos a todas as pessoas, cientistas ou não.

Às agências de fomento CNPq, FAPERJ e Capes pelo financiamento, fundamental para a pesquisa.

# RESUMO

RENATO DE MORAES RIBEIRO

## ESTUDO DA FORMAÇÃO DE “AGGRESOME-LIKE INDUCED STRUCTURES” EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS POR *Listeria monocytogenes*

Orientador: Leonardo Holanda Travassos Corrêa

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e não esporulante. É o agente etiológico da listeriose, uma doença infecciosa de origem alimentar, com taxas de letalidade que podem chegar a 20-30% em alguns grupos de risco. Entre os fatores de virulência importantes para infecção de *L. monocytogenes* estão as internalinas A e B, responsáveis por induzir a internalização da bactéria pela célula hospedeira; Listeriolisina O (LLO) e fosfolipases A e B, responsáveis pelo escape do autofagossomo; e ActA, responsável pela motilidade da bactéria. Em 2002, foi descrita a formação de agregados de ubiquitina em células dendríticas estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, conhecidos como DALIS (do inglês, dendritic cell aggresome-like induced structures). Mais tarde, descobriu-se que esses agregados também possuem p62, uma proteína adaptadora importante para autofagia seletiva, dentre outras funções. Além disso, também se formam em outros tipos celulares, não apenas células dendríticas, sendo neste caso denominados de ALIS (aggresome-like induced structures). Existem evidências da importância desses agregados na maturação de células dendríticas e no processamento antigênico. Entretanto, pouco se sabe sobre sua importância na resposta celular ao estresse e sobre as vias de sinalização envolvidas na sua formação. Dados da literatura, apontam para a formação de ALIS em macrófagos infectados por *L. monocytogenes* de maneira dependente da expressão da listeriolisina O (LLO). No presente estudo, infectamos macrófagos derivados de medula óssea de camundongo com uma cepa selvagem e com uma cepa deletada para o gene de LLO e então utilizamos microscopia de fluorescência para verificar a formação de ALIS em condições onde há ou não tratamento das células com NAC. Também utilizamos western blotting para analisar a expressão de p62/SQSTM1. Nossos resultados demonstraram a formação de ALIS em macrófagos infectados tanto pela cepa selvagem de *L. monocytogenes* quanto pela cepa deletada para o gene *hly*, que codifica a produção de LLO. Além disso, mostramos que a geração de espécies reativas de Oxigênio (ROS) é essencial para a formação de ALIS em células infectadas pela cepa deficiente em LLO, mas não pela cepa selvagem.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, agregação de proteínas, ALIS, Autofagia

# ABSTRACT

RENATO DE MORAES RIBEIRO

FORMATION OF “AGGRESOME-LIKE INDUCED STRUCTURES” IN MICE MACROPHAGES  
INFECTED BY *Listeria monocytogenes*

Advisor: Leonardo Holanda Travassos Corrêa

*Listeria monocytogenes* is a gram-positive, facultative anaerobe and non-spore forming bacteria. It is the causative agent of listeriosis, a food-borne infectious disease, with lethality rate ranging up to 30% in some risk group. Among the virulence factors important for *L. monocytogenes* infection are internalins A and B, responsible for bacteria entry in the cell; Listeriolysin O (LLO) and phospholipases A and B, responsible for vacuole escape; and ActA, responsible for intracellular motility. In 2002, the formation of ubiquitin aggregates was described in dendritic cells treated with lipopolysaccharide (LPS), the aggregates were named DALIS (dendritic cell aggresome-like induced structures). Later, researchers discovered the presence of p62, an adaptor protein important for selective autophagy, in these aggregates. It has also been reported the presence of DALIS in other cell types than dendritic cells, in which such aggregates are termed ALIS (aggresome-like induced structures). Very little is known about the functions of these structures and signaling pathways involved in its induction. Despite that, some evidence suggests that ALIS formation is important for antigens processing, amongst other functions. Literature data show the formation of ALIS in macrophages infected by *L. monocytogenes* in a LLO dependent manner. In the present study we infected mouse bone marrow derived macrophages with a wild type strain of *L. monocytogenes* and a knock out for LLO gene strain, and then used fluorescence microscopy to analyze ALIS formation in cells treated or not with NAC. We also analyzed p62/SQSTM1 expression using western blotting. Our results showed ALIS formation in cells infected by the wild type strain of *L. monocytogenes* and by the *hly* knock out, that do not express LLO. We also show that the generation of reactive Oxygen species (ROS) is essential for ALIS formation in cells infected by the knock out strain, but not by the wild type.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, protein aggregation, ALIS, autophagy



## Lista de figuras

<b>Figura 1: Etapas da listeriose humana.....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2: Mecanismos de invasão e escape do vacúolo de <i>L. monocytogenes</i>. ....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3: Via autofágica. ....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 4: Domínios de interação da proteína p62.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 5: Infecção por <i>L. monocytogenes</i> induz a formação de ALIS em macrófagos.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 6: Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por <i>L. monocytogenes</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 7: Produção de ROS é necessária para a formação de ALIS em células infectadas por <i>L. monocytogenes</i> <math>\Delta hly</math>.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 8: Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por <i>L. monocytogenes</i> na presença ou ausência de NAC <math>\Delta hly</math>.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 9: Expressão de p62 em macrófagos infectados por <i>L. monocytogenes</i> na presença ou ausência de NAC.....</b>	<b>20</b>

## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
	1.1 Gênero <i>Listeria</i> .....	1
	1.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
	1.1.2 Ciclo infeccioso de <i>L. monocytogenes</i> .....	2
	1.2 Autofagia.....	4
	1.2.1 Via autofágica.....	5
	1.2.2 Autofagia seletiva mediada por p62/SQSTM1.....	7
	1.3 Aggresome-like induced structures (ALIS).....	8
2	JUSTIFICATIVA.....	10
3	OBJETIVOS.....	11
	3.1 Objetivos específicos.....	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
	4.1 Reagentes.....	12
	4.2 Camundongos.....	12
	4.3 Meio condicionado L929.....	12
	4.4 Cultura de células.....	13
	4.5 Plaqueamento de células e estímulos.....	13
	4.6 Infecção.....	13
	4.7 Microscopia de fluorescência.....	14
	4.8 Western blotting.....	14
	4.9 Análise estatística.....	15
5	RESULTADOS.....	16
	5.1 Infecção por <i>L. monocytogenes</i> induz a formação de ALIS em macrófagos.....	16
	5.2 Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por <i>L. monocytogenes</i> .....	16
	5.3 Produção de ROS é necessária para formação de ALIS em macrófagos infectados por <i>L. monocytogenes</i> $\Delta hly$ .....	17
	5.4 Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por <i>L. monocytogenes</i> na presença ou ausência de NAC.....	18
	5.5 Expressão de p62 em macrófagos infectados por <i>L. monocytogenes</i> na presença ou ausência de NAC.....	19
6	DISCUSSÃO.....	21
7	CONCLUSÕES.....	23
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

# 1 Introdução

## 1.1 Gênero *Listeria*

A primeira espécie do gênero *Listeria* foi isolada por Murray e colaboradores, em 1926, de porquinhos-da-índia e coelhos, sendo originalmente chamada de *Bacterium monocytogenes* (Murray, Webb e Swann, 1926). Esse nome se deve ao fato de os pesquisadores terem encontrado uma grande quantidade de monócitos nos animais infectados. No ano seguinte, uma bactéria idêntica foi isolada por Pirie em roedores e chamada de *Listerella hepatolytica*, em homenagem a Sir Joseph Lister (Pirie, 1927). Até que, em 1940, a nomenclatura foi padronizada e a bactéria passou a ser chamada de *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

O gênero *Listeria* pertence ao filo Firmicutes, sendo composto por bacilos gram-positivos, que não formam esporos. Podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Também podem ser móveis ou não (Orsi e Wiedmann, 2016).

Atualmente são conhecidas 17 espécies pertencentes a este gênero (Weller *et al.*, 2015). As únicas espécies patogênicas são a *L. monocytogenes* e a *L. ivanovii*, esta última, entretanto, é mais comumente um patógeno animal, geralmente isolada de gados (Cossart, 2007).

### 1.1.1 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma doença infecciosa de origem alimentar, com taxas de letalidade que podem chegar a 20-30% em alguns grupos de risco (Allerberger e Wagner, 2009). Essa bactéria é comumente isolada de amostras ambientais como água e solo, entretanto, também pode ser isolada de alimentos como carnes malcozidas e laticínios não pasteurizados (Mclauchlin *et al.*, 2004). Apesar de ser uma bactéria patogênica, muito bem adaptada ao hospedeiro humano, ela também sobrevive muito bem no meio-ambiente, podendo sobreviver a altas concentrações de sal e crescer em uma ampla faixa de temperatura (4°C-45°C), além de ser anaeróbia facultativa (Low e Donachie, 1997).

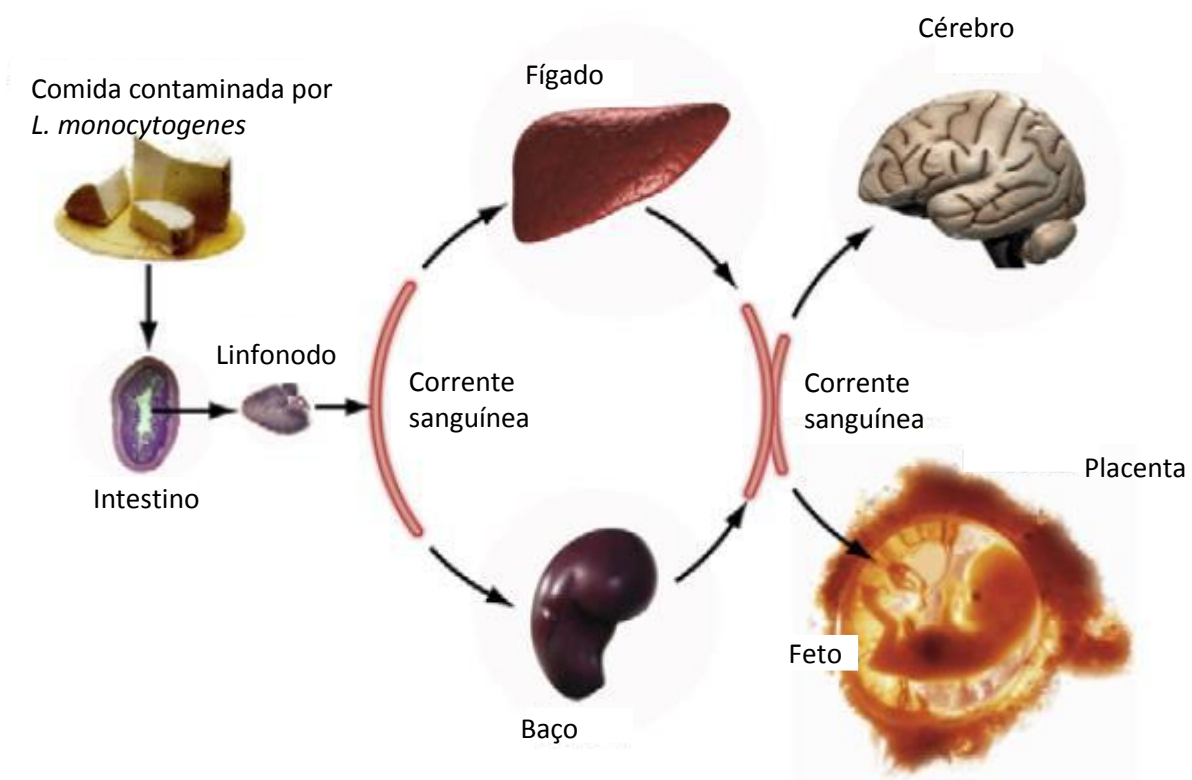
Indivíduos imunocompetentes, em geral, desenvolvem uma gastroenterite, podendo ter febre. Entretanto, pacientes imunocomprometidos, como idosos e pacientes sob tratamento imunossupressor, podem desenvolver quadros mais graves como septicemia e meningoencefalite. Ademais, mulheres grávidas infectadas podem sofrer parto prematuro e aborto (Camejo *et al.*, 2011). Não obstante, também já foram descritos casos de infecção

cutânea, infecção em articulações, miocardite e endocardite causados por *L. monocytogenes* (Gilchrist, 2009; Kleemann *et al.*, 2009; Kelesidis *et al.*, 2010).

Nos últimos 7 anos, tem ocorrido pelo menos um surto de listeriose por ano apenas nos Estados Unidos. Na maioria dos casos, as infecções se deram pelo consumo de produtos derivados do leite como queijos e sorvetes. O caso mais recente ocorreu em maio de 2017: 8 pessoas, de cidades diferentes, foram infectadas e hospitalizadas após o consumo de queijo contaminado, tendo ocorrido duas mortes (CDC, 2017).

### 1.1.2 Ciclo infeccioso de *L. monocytogenes*

A infecção, em geral, começa através da ingestão de alimentos contaminados. Ao chegar no trato gastrointestinal a bactéria atravessa a barreira intestinal. Caso o sistema imune não contenha a infecção, a bactéria pode chegar aos linfonodos, caindo então na corrente sanguínea e se disseminando (Fig. 1). Além de cruzar a barreira intestinal, *L. monocytogenes* também é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica, podendo causar meningoencefalite, e a placenta, o que pode acarretar em complicações na gravidez (Cossart e Toledo-Arana, 2008).



**Figura 1: Etapas da listeriose humana.** Adaptado de Cossart e Toledo-Arana, 2008

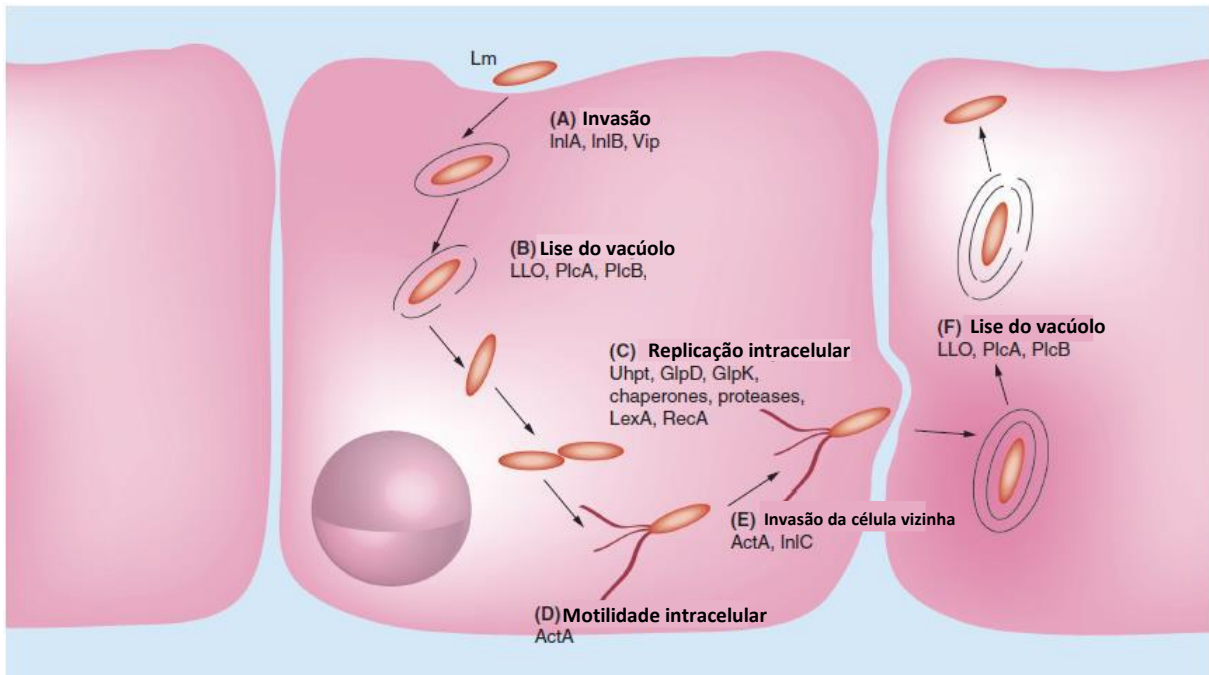
*L. monocytogenes* pode infectar diversos tipos celulares, incluindo células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas, e células não fagocíticas, como células epiteliais e endoteliais (Camejo *et al.*, 2011).

Os principais genes de virulência de *L. monocytogenes* são regulados pela proteína PrfA, que é ativada a uma temperatura de 37°C. Entre esses genes estão *inlA* e *inlB*, responsáveis pela invasão; *hly*, *plcA* e *plcB*, responsáveis pelo escape do fagossomo; *actA* e *inlC*, responsáveis pela motilidade e invasão de células vizinhas, respectivamente (Heras, Cains e Bielecka, 2011)

As principais moléculas da superfície da bactéria responsáveis pela sua internalização são a Internalina A (InlA), que interage com a E-caderina, e InlB, que interage com a tirosina quinase Met. Essas interações promovem um remodelamento do citoesqueleto que leva à fagocitose da bactéria (Mengaud *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2000).

Após ser internalizada, a maturação do vacúolo contendo a bactéria é atrasada através da inibição da atividade da GTPase Rab5a, uma proteína importante para a maturação do endossomo, pela GAPDH (do inglês, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) bacteriana (Alvarez-Dominguez *et al.*, 2008). O escape para o citoplasma ocorre principalmente pela ação da listeriolisina O (LLO), uma toxina que se insere na membrana do vacúolo, formando poros. Além disso, duas fosfolipases C também atuam no escape, PlcA e PlcB (Beauregard *et al.*, 1997; Marquis *et al.*, 1995).

Já no citoplasma, *L. monocytogenes* utiliza a proteína ActA para se locomover. Essa proteína é responsável por recrutar proteínas do citoesqueleto como o complexo Arp2/3 e Ena/VASP, o que promove a polimerização da actina em um dos polos da bactéria, gerando impulso (Kocks *et al.*, 1992; Welch *et al.*, 1998). Esse mecanismo também é importante para a invasão de células vizinhas, através da formação de protrusões. Outra proteína importante para a invasão das células vizinhas é a InlC (Rajabian *et al.*, 2009). Ao invadir uma nova célula a bactéria se encontra em um vacúolo com duas membranas. Para escapar desse vacúolo, a bactéria utiliza tanto a LLO como a PlcA e PlcB (Alberti-Segui, Goeden e Higgins, 2007)



**Figura 2: Mecanismos de invasão e escape do vacúolo de *L. monocytogenes*.** Adaptado de Pillich, Chakraborty e Mraheil, 2015.

## 1.2 Autofagia

Todos os organismos vivos passam por uma constante renovação de suas biomoléculas. Essa renovação requer a produção de novas moléculas, bem como a degradação de moléculas velhas a fim de, inclusive, servirem como matéria prima para processos anabólicos.

Neste sentido, as células eucarióticas possuem duas vias clássicas de degradação de biomoléculas, a via proteassomal e a via lisossomal. A via proteassomal é mais específica, degradando somente proteínas marcadas com ubiquitina que possuem, em geral, tempo de vida curto. Já a via lisossomal, pode degradar proteínas advindas de diversas vias, como a via endocítica e a via autofágica. (Mizushima e Komatsu, 2011)

A autofagia é um mecanismo de degradação de componentes citoplasmáticos, sendo importante para a reciclagem de proteínas e organelas, mantendo assim a homeostase da célula. Além disso, já foi descrita a participação da autofagia na degradação de microrganismos e na apresentação de antígenos (Gutierrez *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2004; Paludan *et al.*, 2005).

Já é conhecido na literatura que defeitos no processo de autofagia estão fortemente relacionados com diversos contextos patológicos como doenças neurodegenerativas, doenças

hepáticas, doenças musculares, doenças cardíacas, diabetes mellitus e câncer (Gonzales *et al.*, 2017; Levine e Kroemer, 2008).

A autofagia pode ser dividida em três tipos: A microautofagia, a macroautofagia e a autofagia mediada por chaperonas. Na microautofagia há o englobamento de componentes citoplasmáticos por invaginações da membrana do lisossomo (Sahu *et al.*, 2011). Já na macroautofagia (a partir daqui referida apenas como autofagia) há a formação do fagóforo, uma estrutura de dupla membrana que sequestra parte do citoplasma, formando o autofagossomo, e posteriormente se funde ao lisossomo, formando o autolisossomo (Mizushima e Komatsu, 2011). Por fim, a autofagia mediada por chaperonas consiste no sequestro de proteínas por chaperonas citosólicas HSPA8/HSC70 e direcionamento para a via lisossomal através da interação com a proteína Lamp-2A (Orenstein e Cuervo, 2010).

Sabe-se que a autofagia é importante em diversas funções celulares, podendo ser específica (autofagia seletiva) ou não específica. A autofagia seletiva atua, entre outras coisas, na degradação de organelas como a mitocôndria (mitofagia), na degradação de agregados proteicos (agrefagia) e na degradação de bactérias e vírus (xenofagia) (Into *et al.*, 2012; Vasconcellos *et al.*, 2016). Além disso, pode ser regulada por diversos receptores da imunidade inata entre TLRs e NLRs (Carneiro e Travassos, 2013; Delgado *et al.*, 2008). Assim, exerce funções importantes na imunidade inata, além da já citada xenofagia, tendo papel na regulação da fagocitose, no processamento de antígenos, na secreção de citocinas e na modulação do inflamossomo (Allaeyts, Marceau e Poubelle, 2013).

A xenofagia é extremamente importante na eliminação de patógenos bacterianos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri* e *L. monocytogenes*, entre outros (Knodle e Celli, 2011). Apesar do mecanismo ainda não ter sido esclarecido, sabe-se que a principal proteína responsável pelo escape da xenofagia pela *L. monocytogenes* é a ActA, a mesma proteína responsável pela motilidade intracelular (Yoshikawa *et al.*, 2009).

### **1.2.1 Via autofágica**

No começo da via autofágica há a formação do fagóforo, esse processo é chamado comumente de ‘iniciação’ e tem como função iniciar o isolamento de uma porção do citoplasma, sendo regulado por um complexo gerado a partir da quinase ULK1 (ULK1-ATG13-FIP200). Esse complexo leva à formação de um outro complexo contendo beclina-1 e

VPS34 (AMBRA1-ATG14-BECN1-VPS34), que dá início ao processo de nucleação, onde VPS34 catalisa a conversão de fosfatidilinositol (PI) em fosfatidilinositol-3 fosfato (PI(3)P), um fosfolípido importante para o recrutamento de outras proteínas para o fagóforo. Após a nucleação há a elongação, processo no qual há o recrutamento de MAP-LC3-II (do inglês, microtubule-associated protein 1 light chain 3 II) pelo complexo Atg5-Atg12-Atg16L. Esse recrutamento, leva à curvatura e fechamento do fagóforo, formando o autofagossomo. Importante ressaltar que o LC3-II é produto da clivagem de LC3-I por Atg4B, que expõe os resíduos de glicina de LC3-I e permite sua conjugação com fosfatidiletanolamina, formando assim o LC3-II (Hussey, Travassos e Jones, 2009) (Fig. 3).

Por fim, o autofagossomo passa por dois processos de maturação, sendo o primeiro a fusão com endossomos multivesiculares, formando o anfissomo, e o segundo a fusão com lisossomos, formando o autolisossomo. Ambos os processos de maturação, principalmente o segundo, levam a uma diminuição de pH que permite a ativação de hidrolases que irão degradar o conteúdo do autolisossomo (Berg *et al.*, 1998).

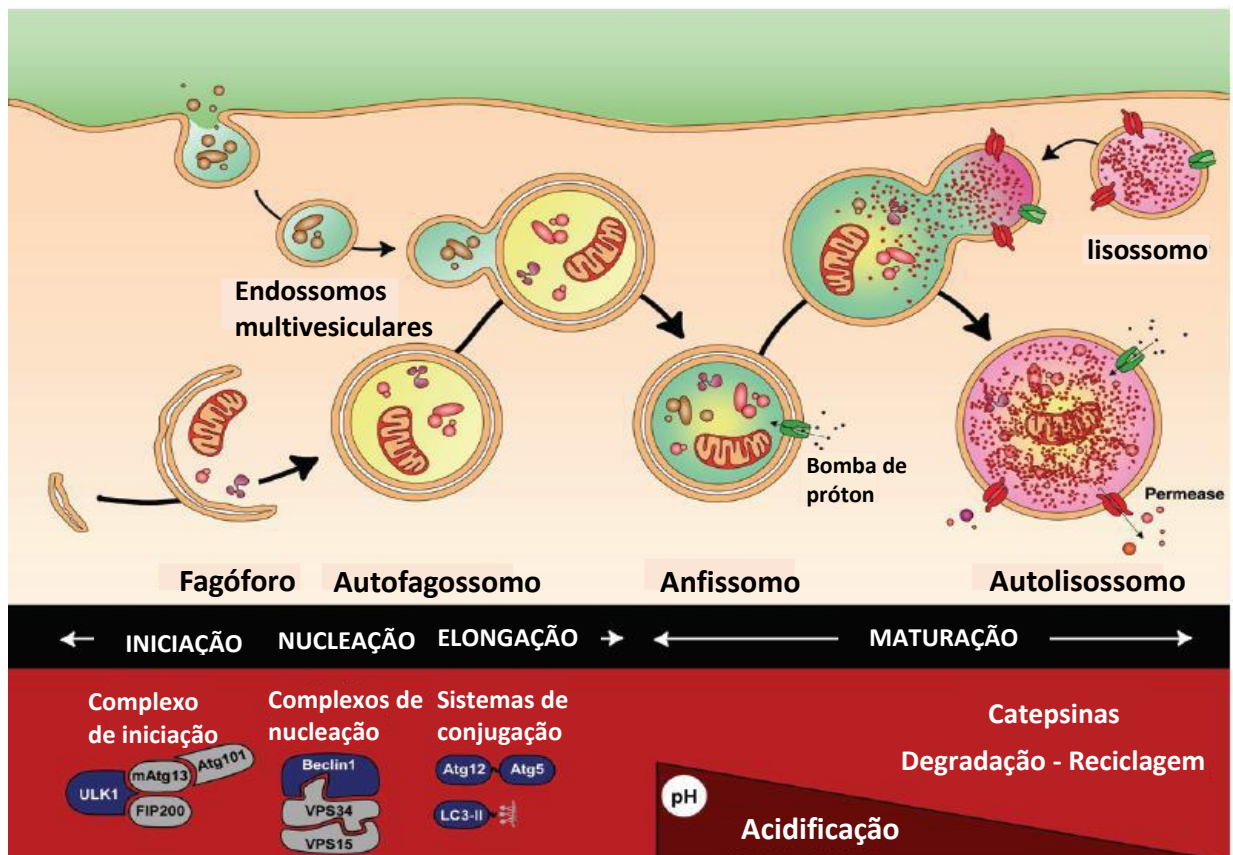


Figura 3: Via autofágica. Adaptado de Puissant, Fenouille e Auburger, 2012.



## 1.2.2 Autofagia seletiva mediada por p62/SQSTM1

Como dito anteriormente, a autofagia também pode ser um processo seletivo. Isso acontece devido à atuação de proteínas adaptadoras como NDP52 (do inglês, nuclear dot protein 52) (Verlhac *et al.*, 2015), NBR1 (do inglês, neighbor of BRCA1) (Deosaran *et al.*, 2013), optneurina (Wild *et al.*, 2011) e p62/SQSTM1 (do inglês, Sequestosome 1) (Pankiv *et al.*, 2007).

A proteína p62 possui diversos domínios que permitem sua interação com outras proteínas como MEKK3, MEK5, ERK1, TRAF6, PKC $\zeta$ , PKC $\iota/\lambda$  e Keap1, atuando assim em variadas vias de sinalização (Puissant, Fenouille e Auberger, 2012). Entre esses domínios está o UBA (do inglês, “ubiquitin-associated domain”), que se liga à ubiquitina e é, portanto, importante para a autofagia seletiva, tendo sua afinidade aumentada quando fosforilado nas posições S409 e S405 (equivalente a S403 de humanos) (Lim *et al.*, 2015). Outros domínios importantes para a autofagia seletiva são os domínios LIR (do inglês, “LC3-interacting region”), de interação com LC3, e o domínio PB1 (do inglês, “Phox/Bemp1”), de oligomerização (Bjørkøy *et al.*, 2005; Ichimura *et al.*, 2008; Pankiv *et al.*, 2007). Dessa forma, p62 faz uma ponte entre os substratos ubiquitinados e o autofagossomo, permitindo a degradação específica do material selecionado e fornecendo uma via de degradação de proteínas alternativa à via proteassomal (Fig. 4). Já foi observada a participação de p62 em processos como agrefagia, mitofagia, xenofagia e zimofagia (autofagia de partículas de zimogênio) (Rogov *et al.*, 2014).

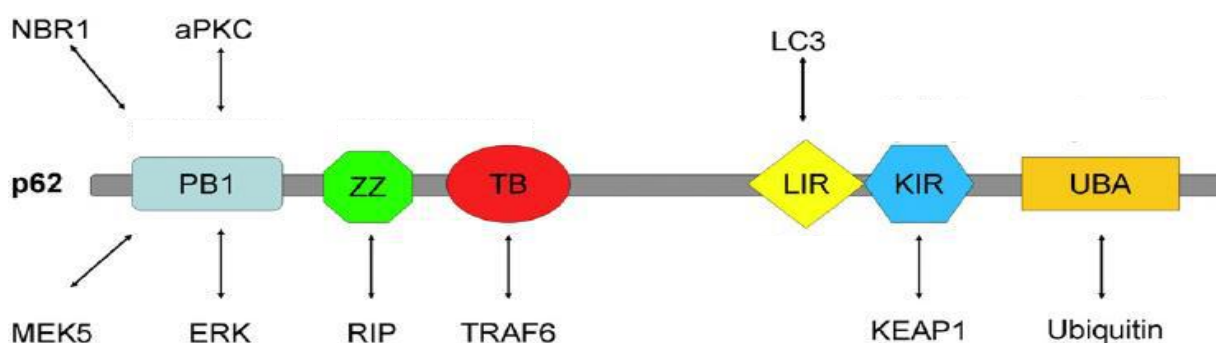


Figura 4: Domínios de interação da proteína p62. Adaptado de Stepkowski e Kruszewski, 2011.

Não obstante, p62 também é importante para a resposta antioxidante da célula, uma vez que permite a estabilização de Nrf2, um fator transcricional que leva à síntese de proteínas antioxidantes e também de p62. Isso é possível devido à interação de p62 com Keap1, uma proteína que normalmente se liga à Nrf2 e a leva para degradação proteassomal.

Assim, a interação de p62 com Keap1 leva a um aumento da transcrição dos genes alvos de Nrf2, incluindo a própria p62, o que constitui um processo de retroalimentação positiva (Komatsu *et al.*, 2010).

Como mencionado, p62 participa de diversas vias de sinalização e seu papel biológico ainda está longe de ser completamente elucidado. Já foi observado, por exemplo, a atuação de p62 em autofagia de substratos não ubiquitinados (Watanabe e Tanaka, 2011). Também já foi observada a sua participação na agregação de caspase-8 ubiquitinada, sendo essa agregação necessária para a indução de apoptose (Jin *et al.*, 2009). Komatsu e colaboradores descreveram que a inibição de autofagia leva à formação dependente de p62 de agregados proteicos que causam danos hepáticos e neurais (Komatsu *et al.*, 2007). Além disso, Nihira e colaboradores mostraram que a inibição de p62 levava à morte autofágica de células de carcinoma (Nihira *et al.*, 2014). Fica evidente, portanto, que além de ser um receptor autofágico, p62 é importante em diversas vias e a sua desregulação pode levar a patologias. Contudo, é visível o potencial que essa proteína apresenta como alvo molecular para o tratamento de diversas doenças.

### **1.3 Aggresome-like induced structures (ALIS)**

Lelouard e colaboradores descreveram, em 2002, a formação de agregados contendo proteínas ubiquitinadas em células dendríticas e os nomeou “dendritic cell aggresome-like induced structures” (DALIS), uma vez que não podiam ser considerados agressomos, já que não se colocalizavam com  $\gamma$ -tubulina e com vimentina, e sua formação era transiente. Naquele mesmo estudo, eles descreveram que esses agregados eram formados por produtos ribossomais defeituosos (DRiPs) que são, em geral, ubiquitinados e degradados logo depois de sua síntese. Eles também viram que a formação de DALIS não afetava a função proteassomal e que os DALIS eram compostos por DRiPs recém-sintetizados. Os agregados eram observados cerca de 4h após estímulo LPS e alcançavam o pico 8h após a estimulação, desaparecendo cerca de 24 a 36 horas depois. Os autores propuseram que DALIS pudesse fazer parte do processo de maturação da célula dendrítica, uma vez que sua cinética coincide com a cinética de maturação dessas células. Também foi proposto que esses agregados pudessem servir como estoque antigênico, uma vez que os DRiPs constituem a maior fonte de antígenos para apresentação via MHC de classe 1, além disso, o tempo preciso de formação

de DALIS permitiria uma coordenação do processamento antigênico com o tempo de chegada da célula dendrítica no linfonodo (Lelouard *et al.*, 2002).

Em um estudo posterior, Lelouard e colaboradores confirmaram a capacidade desses agregados de armazenarem DRiPs. Além disso, também observaram um acúmulo de enzima ativadora de ubiquitina E1, enzima conjugadora de ubiquitina E2<sub>25k</sub> e de ubiquitina ligase de interação com o COOH terminal de Hsp70 na área central dos DALIS. Essas proteínas são importantes para a ubiquitinação de DRiPs e sua incorporação no DALIS, evitando que sejam degradados rapidamente no citosol (Lelouard *et al.*, 2004).

Em 2005, estruturas iguais às DALIS foram observadas em macrófagos murinos mediante estímulo com LPS. Assim, essas estruturas passaram a ser chamadas de ALIS (do inglês, “aggresome-like induced structure”) uma vez que não estão presentes apenas em células dendríticas (Canadien *et al.*, 2005).

Visto que p62 possui um domínio de interação com ubiquitina e um domínio de oligomerização, foi proposto que p62 pudesse fazer parte da estrutura das ALIS. Isso se mostrou verdadeiro nos estudos publicados pelo grupo do Terje Johansen. Nesses estudos foi mostrada a importância de p62 para a degradação de ALIS por autofagia bem como para a própria formação dessas estruturas (Bjørkøy *et al.*, 2005; Pankiv *et al.*, 2007).

Concomitantemente, Szeto e colaboradores descreveram a formação de ALIS em células não pertencentes ao sistema imune como HeLa (adenocarcinoma cervical humano), DU145 (carcinoma de próstata humano), HSF4212 (fibroblasto primário de pele humano) e COS-7 (fibroblasto de rim de macaco). Além disso, esse grupo também demonstrou que ALIS pode ser formado mediante diversos tipos de estresse como estresse oxidativo e choque térmico (Szeto *et al.*, 2006). Nosso grupo também já observou a formação de ALIS mediante estresse oxidativo provocado por heme e ferro (Vasconcellos *et al.*, 2016)

Em 2011, Viala e colaboradores publicaram um trabalho no qual demonstraram a formação de agregados de ubiquitina e p62 em macrófagos murinos infectados por *L. monocytogenes* (Viala *et al.*, 2008). No estudo em questão foi observado que, para que os agregados sejam formados, é necessária a atividade da LLO.

## 2 Justificativa

Apesar de já terem sido descritos há 15 anos, pouco se sabe sobre a importância biológica das ALIS, tanto em nível celular como em nível tecidual e sistêmico. Alguns estudos já foram publicados demonstrando possíveis funções dessas estruturas nas respostas à diversos tipos de estresse. Além disso, foi proposto que as ALIS podem ter importância na apresentação de antígenos, etapa fundamental para uma resposta imune adaptativa. Também já foi mostrada a indução de ALIS via TLR4 (do inglês, Toll-like receptor 4), o que demonstra um possível papel das ALIS na resposta a microrganismos invasores (Fujita *et al.*, 2010). Contudo, nada se sabe ainda sobre qual seria esse papel. Apesar de já ter se demonstrado a formação de ALIS em células infectadas por *L. monocytogenes* (Viala *et al.*, 2008), ainda não sabemos todos os fatores necessários para essa formação, como a necessidade ou não da geração de ROS ou o tempo de permanência da bactéria no vacúolo. Resultados preliminares do nosso laboratório têm demonstrado a indução de ALIS por ligantes de receptores do tipo toll (TLRs) tendo, inclusive, a necessidade de geração de ROS para a indução de ALIS por R848, um agonista de TLR7 e TLR8.

Visto que *L. monocytogenes* é uma bactéria de grande importância médica, que também é comumente utilizada como modelo de estudos para infecções bacterianas intracelulares, e que muito pouco se sabe sobre a importância das ALIS frente a infecções, fica evidente que esta é uma linha de investigação promissora, que pode nos fornecer tanto informações a respeito da patogênese dessa bactéria como da resposta celular a uma infecção bacteriana.

### **3 Objetivos**

Investigar os mecanismos e fatores de virulência de *L. monocytogenes* envolvidos na formação de ALIS em macrófagos murinos.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Confirmar a formação de ALIS por *L. monocytogenes* em macrófagos murinos;
- Quantificar a formação de ALIS por *L. monocytogenes* em macrófagos murinos;
- Avaliar a importância de ROS no contexto de uma cepa de *L. monocytogenes* que leva mais tempo para escapar para o citosol.

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Reagentes**

O meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de HEPES e L-Glutamina foi obtido da empresa Lonza (Basileia, Suíça). O soro fetal bovino e a penicilina/estreptomicina foram obtidos da LGC Biotecnologia (São Paulo, Brasil). O anticorpo FK2, para proteínas poli- e monoubiquitinadas, foi comprado da empresa Enzo Life Sciences (Nova Iorque, Estados Unidos). O anticorpo anti-p62 foi obtido da empresa Abcam (Cambridge, Reino Unido). Os anticorpos anti- $\beta$ -actina, anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase, a albumina bovina (BSA), a N-Acetil-L-cisteína (NAC) e o cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail foram comprados da empresa Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). O ProLong® Gold Antifade Mountant, o ECL e o anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa Fluor® 488 e anti-IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 546 foram obtidos da ThermoFisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos).

### **4.2 Camundongos**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica C57BL/6. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes a temperatura de 25°C, com ciclos de 12 horas de luz/escuro. Os procedimentos de manuseio, manutenção e experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais do CCS, UFRJ, protocolo IMPPG 011.

### **4.3 Meio condicionado de L929**

Para preparar o meio condicionado de L929 nós descongelamos células L929 e cultivamos em uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> com 5ml de RPMI 10% SFB por 2 dias. Passamos então as células para uma garrafa de 125 cm<sup>2</sup> contendo 25ml de RPMI 10% SFB e mantivemos por mais 2 dias. Passamos então as células para 10 garrafas de 125 cm<sup>2</sup> contendo 25ml de RPMI 10% SFB e mantivemos por 2 dias. Por fim, retiramos os meios das garrafas e adicionamos 50ml de RPMI 10% SFB. Incubamos por 7 dias. Ao final desse período, filtramos o meio em membranas de 0,22 $\mu$ m e congelamos a -80°C.

#### 4.4 Cultura de células

Foram usados macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 selvagens. As células de medula foram retiradas do fêmur e da tíbia por centrifugação a 3220 x *G* por 4 minutos. Após isso, foram plaqueados em placas de Petri para cultura de células contendo 10 mL de meio de diferenciação (RPMI com 30% de meio condicionado de células L929, 20% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/streptomicina) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de 3 dias de incubação, foram adicionados mais 10 mL de meio de diferenciação. Após 5 dias, o meio foi retirado para remover as células não aderidas e as células aderidas foram mantidas em gelo para que houvesse descolamento. As células foram contadas em câmaras de Neubauer e plaqueadas para os experimentos de microscopia e para os extratos de western blotting.

#### 4.5 Plaqueamento das células

Para a microscopia de fluorescência, foram plaqueadas 1,5 x 10<sup>4</sup> células por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, sendo incubadas por 36 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o western blotting, o plaqueamento foi feito com 5 x 10<sup>5</sup> células por poço em placas de 6 poços. Nas condições experimentais onde há o tratamento com NAC, 1 hora antes da infecção as células são tratadas com o NAC 20mM.

#### 4.6 Infecção

As cepas utilizadas nos experimentos foram a *L. monocytogenes* 10403S e a *L. monocytogenes* 10403S  $\Delta hly$ , que possui uma deleção “in frame” para o gene *hly*. Ambas as cepas foram cedidas pelo Dr. Daniel Portnoy (Berkeley, California).

No dia anterior ao experimento, as duas cepas da bactéria foram cultivadas em meio BHI (do inglês, brain heart infusion) líquido, deixadas ‘overnight’ a 37°C, sob agitação. No dia seguinte, as culturas foram diluídas 1:10 em meio BHI e incubamos por 2 horas a 37°C, sob agitação. A densidade ótica foi medida em um espectrofotômetro (absorbância=660nm) para calcular a densidade de bactérias no meio. O meio contendo as bactérias foi centrifugado a 10000 x *G* por 5 minutos e o precipitado ressuscitado em 3ml de meio RPMI 10% SFB. O

volume correspondente a uma MOI de 10 foi então aplicado nos poços contendo os macrófagos. A placa contendo as células infectadas foi centrifugada a 200 x G por 2 minutos, a 24°C, e deixada na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Por fim, o meio dos poços foi retirado e substituído meio RPMI 10% SFB contendo gentamicina 100nM, dando início então à contagem dos tempos de infecção.

#### **4.7 Microscopia de fluorescência**

Após fixadas com PBS/paraformaldeído 4% por 15 minutos, as células foram lavadas com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) e permeabilizadas com PBS contendo 0,1% de Triton-X. Em seguida, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS/BSA 5% e uma incubação de 30 minutos com PBS/BSA 1%. Depois as células foram incubadas por 1h com o anticorpo primário de camundongo anti-FK2 (1:1000), e com o anticorpo de coelho anti-p62 (1:2000) diluídos em PBS/BSA 5%. Depois foram feitas 3 lavagens com PBS e mais 3 com PBS/BSA 5%. Então foi feita a incubação com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor® 488 (1:1000) e anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor® 546 (1:1000) diluídos em PBS/BSA 5%. As lamínulas foram então montadas em lâminas utilizando um meio de montagem que contém DAPI. As imagens foram obtidas em aumento de 63x, sendo tiradas fotos de mínimo 7 campos diferentes de cada lamínula, escolhidos aleatoriamente. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (NIH). Para a contagem de células, foram contados o número de núcleos marcados por DAPI. Para determinar a quantidade de agregados de p62 e ubiquitina por célula, o número de agregados foi dividido pelo número de células analisadas. O microscópio utilizado foi o Leica CTR 6000, utilizando o software LAS AF Lite, da Leica (Wetzlar, Alemanha).

#### **4.8 Western blotting**

Após as infecções, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e lisadas através da incubação com 80µl de tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, 1% Igepal CA-630, 0.5% desoxicolato de sódico e 0.1% dodecil sulfato de sódio) com inibidor de protease por 5 minutos em gelo. Depois disso, foi feita uma lise mecânica com um scraper. O lisado foi então centrifugado a uma velocidade de 24958 x G por 15 minutos a 4°C e o



sobrenadante recolhido. O extrato celular foi desnaturado em tampão de amostra (Tris-HCl 50mM, pH 6,8, contendo SDS 1%, 2-Mercaptoetanol 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol) e fervido por 7 minutos. As amostras foram então separadas por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%) a 60V. Foi feita então a transferência para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) sensibilizada por 1 minuto em metanol. A transferência foi feita em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, 20% de metanol, pH 8,3) por 30 minutos 25V e 1A, utilizando o aparelho Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System, da Bio-rad (Berkeley, California). A membrana foi então lavada com TBS-T (Tris 20mM, NaCl 500mM, 0,05% de Tween, pH 7,4) e bloqueada com solução TBS-T contendo 5% de leite desnatado por 1 hora. Foi feita então uma incubação overnight com anticorpo primário de coelho anti-p62 (1:1000) e com anticorpo primário de rato anti- $\beta$ -actina (1:10000) diluídos na solução TBS-T 5% leite à 4°C. Após essa primeira incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e foi feita a incubação de 1 hora com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho (1:5000) e anti-IgG de camundongo (1:5000) conjugados à peroxidase. Por fim, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T e reveladas em filmes Kodak MXG/Plus, com ECL.

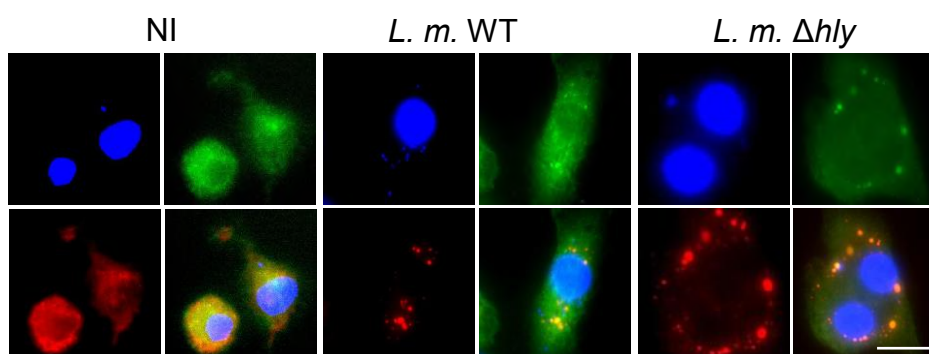
#### **4.9 Análise estatística**

Foram realizados os seguintes testes estatísticos: ANOVA de uma via e o teste t de Student. Ambos os testes foram realizados utilizando o software Prism 6 (GraphPad Software).

## 5 Resultados

### 5.1 Infecção por *L. monocytogenes* induz a formação de ALIS em macrófagos

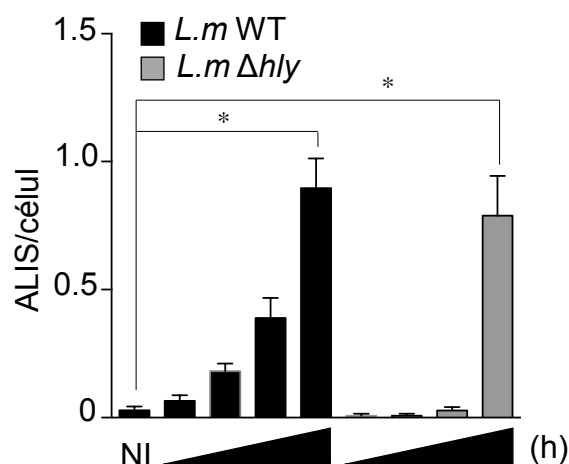
A fim de verificar se a infecção por *L. monocytogenes* seria capaz de induzir a formação de ALIS, infectamos BMDMs com a cepas selvagem. Como na literatura já foi demonstrado que a formação de ALIS induzido por *L. monocytogenes* é dependente de LLO, decidimos também infectar macrófagos com a cepa deletada para o gene da LLO. As infecções foram feitas nos tempos de 1h, 2h, 4h e 8h, e procedemos à marcação para p62 e ubiquitina, para analisar a formação de agregados através de microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que tanto a cepa selvagem como a deletada para LLO são capazes de induzir a formação de agregados de p62 e ubiquitina colocalizados, o que nós consideramos como ALIS, no tempo de 8h (Fig. 5).



**Figura 5: Infecção por *L. monocytogenes* induz a formação de ALIS em macrófagos.** BMDMs infectados por 8h marcados para ubiquitina (verde), p62/SQSTM1 (vermelho) e núcleo (azul); Experimento representativo entre 3 experimentos independentes. MOI=10. Barra de escala=10 $\mu$ m.

### 5.2 Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por *L. monocytogenes*

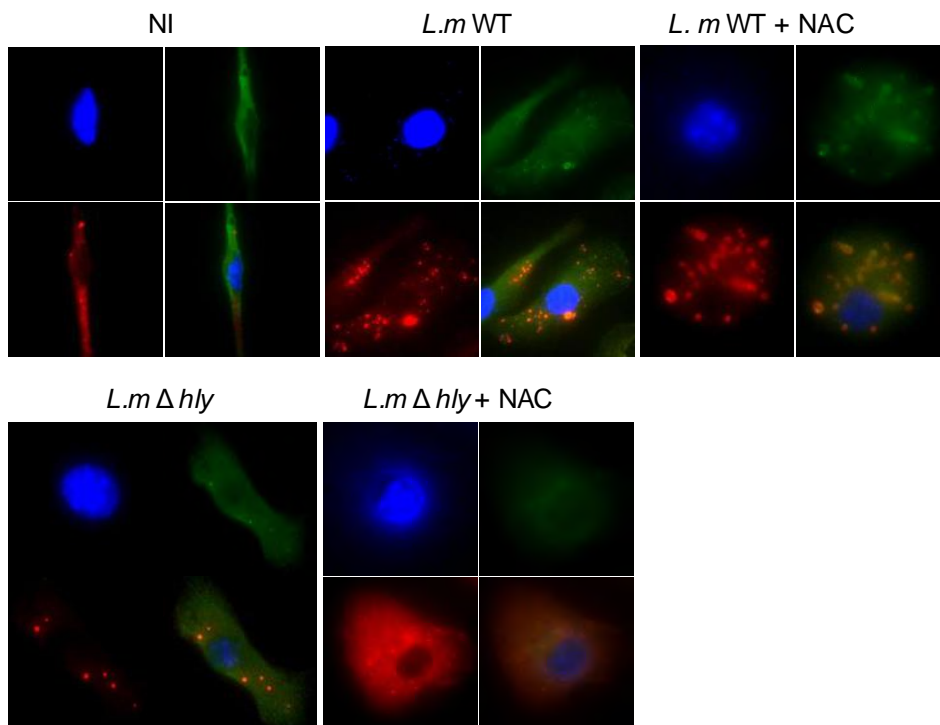
Uma vez confirmada a formação de ALIS por *L. monocytogenes* em macrófagos murinos, decidimos realizar uma quantificação de agregados onde há colocalização de p62 e ubiquitina. A quantificação confirmou a análise qualitativa das imagens. Além disso, ficou demonstrado que, entre os tempos de infecção testados, a maior concentração de ALIS ocorreu no tempo de 8h, tanto para os macrófagos infectados pela cepa selvagem como pela cepa deletada em LLO (Fig. 6).



**Figura 6: Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por *L. monocytogenes*.** Quantificação de ALIS em BMDMs infectados por 1h, 2h, 4h e 8h. Média e desvio padrão calculados de acordo com as replicatas técnicas de um experimento representativo de três. MOI=10. Student t-test. \* $p < 0,05$

### 5.3 Produção de ROS é necessária para formação de ALIS em macrófagos infectados por *L. monocytogenes* $\Delta hly$

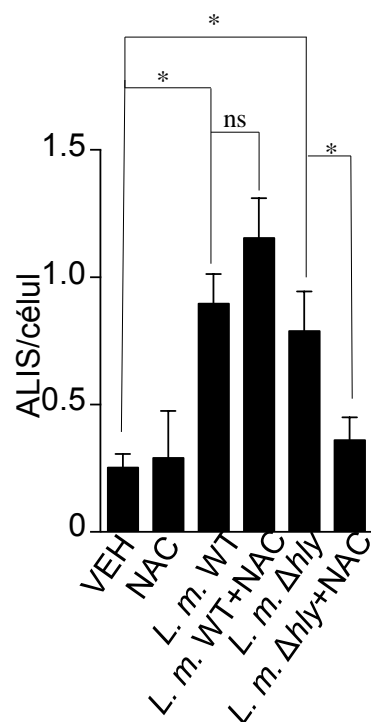
Já foi relatado na literatura a formação de ALIS de forma dependente da produção de ROS (Fujita *et al.*, 2010). Assim, para verificar a importância de ROS na formação desses agregados, realizamos uma marcação para p62 e ubiquitina em BMDMs infectados com as duas cepas na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC), um sequestrador de ROS (Fig.7). Observamos, assim, que o NAC não exerceu qualquer efeito nas células infectadas pela cepa selvagem. Entretanto, a adição de NAC reduziu de modo significativo a formação de ALIS nas células infectadas pela cepa deletada para o gene de LLO.



**Figura 7: Produção de ROS é necessária para a formação de ALIS em células infectadas por *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly.** BMDMs infectados por 8h marcados para ubiquitina (verde), p62/SQSTM1 (vermelho) e núcleo (azul). Experimento representativo entre 3 experimentos independentes. MOI=10. Barra de escala=10 $\mu$ m.

#### 5.4 Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por *L. monocytogenes* na presença ou ausência de NAC

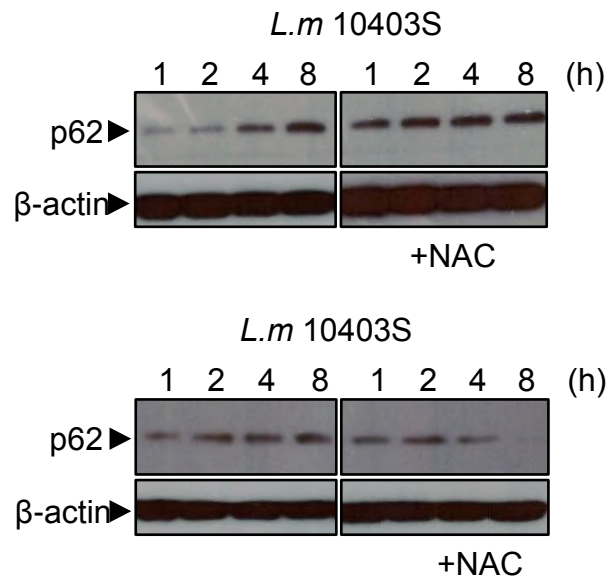
Também realizamos a quantificação de ALIS nas células infectadas pelas duas cepas de *L. monocytogenes* na presença ou ausência de NAC através do software imageJ (Fig. 8). Pudemos, assim, observar que a quantificação confirmou a análise qualitativa das imagens. As cepas selvagem e deletada para o gene de LLO foram capazes de induzir a formação de ALIS. Além disso, adição de NAC não interferiu na formação de ALIS nas células infectadas pela cepa selvagem. Contudo, a adição de NAC reduziu a formação de ALIS nas células infectadas pela cepa deletada para o gene de LLO.



**Figura 8: Quantificação da formação de ALIS em macrófagos infectados por *L. monocytogenes* na presença ou ausência de NAC  $\Delta hly$ .** Quantificação de ALIS em BMDMs infectados por 8h, tratados ou não com NAC. Média e desvio padrão calculados de acordo com as replicatas técnicas de um experimento representativo de três. MOI=10. One-way ANOVA. \* $p < 0,05$

### 5.5 Expressão de p62 em macrófagos infectados por *L. monocytogenes* na presença ou ausência de NAC

Dados da literatura sugerem que a expressão de p62 está diretamente relacionada com a formação de ALIS, portanto, para confirmar os resultados anteriores, realizamos um experimento preliminar que consistiu em analisar a expressão de p62 em BMDMs infectados pelas duas cepas, na presença e ausência de NAC, através de western blotting (Fig. 9). Observamos que, nas células infectadas pela cepa WT, não houve diferença na expressão de p62 entre as tratadas e não tratadas com NAC. Já nas células infectadas pela cepa  $\Delta hly$ , o tratamento com NAC reduziu a expressão de p62 em comparação com as células não tratadas, principalmente no tempo de 8h. Apesar de ser um resultado promissor, ainda carece de confirmação com novos experimentos.



**Figura 9: Expressão de p62 em macrófagos infectados por *L. monocytogenes* na presença ou ausência de NAC.** western blotting de BMDMs infectados por *L. monocytogenes* WT e  $\Delta hly$  nos tempos de 1h, 2h, 4h e 8h, na presença ou ausência de NAC. MOI=10. n=1.

## 6 Discussão

No presente trabalho, demonstramos que a infecção por *L. monocytogenes* é capaz de induzir a formação de ALIS em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos. Entretanto, ainda não está claro se esses agregados são benéficos ou maléficos para a célula. Sabe-se, por exemplo, que a presença de agregados de p62 e ubiquitina em células hepáticas e neurais está associada a um contexto patológico (Komatsu *et al.*, 2007). Há também evidências de que a formação de ALIS aumenta a tolerância inflamatória de macrófagos estimulados com LPS, atenuando a responsividade dessas células ao estímulo inflamatório (Mildenberger *et al.*, 2017). Portanto, é mais provável que a formação destes agregados possa ter efeitos benéficos ou deletérios para a célula, a depender das circunstâncias.

Além disso, mostramos que a *L. monocytogenes* deletada para o gene da LLO também é capaz de induzir a formação de ALIS, o que contraria os resultados obtidos por Viala e colaboradores (Viala *et al.*, 2008). Entretanto, vale ressaltar que o método de contagem de agregados utilizado no estudo foi diferente. Nós quantificamos a média de agregados por célula, enquanto os outros pesquisadores quantificaram a porcentagem de células que continham agregados. Não obstante, no estudo mencionado não haviam controles não infectados.

Também pudemos observar que a geração de ROS é necessária para formação de ALIS em macrófagos infectados pela cepa deletada para o gene da LLO, fato que não foi observado nas células infectadas pela cepa selvagem. O motivo para essa diferença pode estar relacionado com o tempo que *L. monocytogenes* permanece no fagossomo, uma vez que a cepa knock out permanece mais tempo no fagossomo, o que poderia levar à formação de ALIS de forma dependente da geração de ROS pela NADPH oxidase (Nox2). Enquanto a indução de ALIS pela cepa selvagem se dá pela LLO, por um mecanismo desconhecido, porém independentemente da geração de ROS. Entretanto, essa hipótese ainda precisa ser testada. Futuramente pretendemos investigar a formação de ALIS em células knock out para Nox2. Além disso, também pretendemos verificar a formação de ALIS em células infectadas por uma cepa de *L. monocytogenes* deletada para os genes da LLO, da PlcA e da PlcB, que não consegue escapar do vacúolo.

Já foi descrito na literatura a formação de ALIS induzida por patógenos bacterianos (Fujita *et al.*, 2010). Além disso, a existência de mecanismos de bloqueio da formação de ALIS, como os apresentados por *Legionella pneumophila* e por *Salmonella enterica*, nos sugere que esses agregados possuem efeito protetor para as células infectadas (Ivanov e Roy, 2009; Santos *et al.*, 2012). Especula-se que ALIS possa servir como estoque antigênico, para posterior apresentação de antígenos. Outra possível função de ALIS é o sequestro e degradação de toxinas e produtos bacterianos. Não obstante, ALIS pode ter funções no processo de sinalização celular, acredita-se que esses agregados possam constituir um mecanismo de regulação, servindo como uma plataforma de sinalização. Além disso, o acúmulo exagerado dessas estruturas poderia levar a célula a um processo de morte celular programada, o que dificultaria a infecção. Portanto, um mecanismo inibitório da formação de ALIS poderia evitar a morte prematura da célula hospedeira e tornar a infecção viável.

Neste trabalho, demos um passo na investigação da importância da agregação de proteínas na infecção por *L. monocytogenes*. Apesar de ser uma área pouco explorada, nossos resultados se mostraram promissores. Mais estudos são necessários a fim de confirmar nossos dados e de verificar quais as funções das ALIS em uma resposta da célula frente a uma infecção, ou se as ALIS possuem efeito deletério para a célula.



## 7 Conclusões

- Ao contrário do que é encontrado na literatura, tanto a cepas selvagem quanto a  $\Delta hly$  de *L. monocytogenes* são capazes de induzir a formação de ALIS em BMDMs murinos;
- A geração de ROS é um requerimento essencial para a formação de ALIS em BMDMs infectados pela cepa  $\Delta hly$  e não pela cepa selvagem.

## 8 Referências Bibliográficas

- Alberti- Segui, C., Goeden, K. R., & Higgins, D. E. (2007). Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell- to- cell spread. *Cellular microbiology*, 9, 179-195.
- Allaëys, I., Marceau, F., Poubelle, P. E. (2013). NLRP3 promotes autophagy of urate crystals phagocytized by human osteoblasts. *Arthritis research & therapy*, 15, 176.
- Allerberger, F., Wagner, M. (2009). Listeriosis : a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.*16.
- Alvarez- Dominguez, C., Madrazo- Toca, F., Fernandez- Prieto, L., Vandekerckhove, J., Pareja, E., Tobes, R., ... & Carrasco- Marín, E. (2008). Characterization of a *Listeria monocytogenes* protein interfering with Rab5a. *Traffic*, 9(3), 325-337.
- Beauregard, K. E., Lee, K. D., Collier, R. J., Swanson, J. A. (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine*, 186, 1159-1163.
- Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T., Seglen, P. O. (1998). Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes EVIDENCE FOR FUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH BOTH EARLY AND LATE ENDOSOMES. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 21883-21892.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., ... Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology*, 171, 603-614.
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2:5.
- Canadien, V., Tan, T., Zilber, R., Szeto, J., Perrin, A. J., Brumell, J. H. (2005). Cutting edge: microbial products elicit formation of dendritic cell aggresome-like induced structures in macrophages. *The Journal of immunology*, 174, 2471-2475.
- Carneiro, L. A., Travassos, L. H. (2013). The interplay between NLRs and autophagy in immunity and inflammation. *Frontiers in immunology*, 4.
- CDC (2017). Center for Disease Control. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>. Acesso em: 01/12/2017
- Cossart, P. (2007). Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes and Infection*, 9, 1143–1146.
- Cossart, P.; Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology : an overview. *Microbes and Infection*, 10.
- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., & Deretic, V. (2008). Toll- like receptors control autophagy. *The EMBO journal*, 27, 1110-1121.
- Deosaran, E., Larsen, K. B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., ... Brech, A. (2013). NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci*, 126, 939-952.
- Low, J., Donachie, W.. A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *The veterinary journal*. v. 153. 1997.
- Fujita, K. I., Maeda, D., Xiao, Q., & Srinivasula, S. M. (2011). Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4–driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 1427-1432.

- Gilchrist, M. Cutaneous *Listeria* infection. *Journal of Hospital Medicine*. v. 70, n. 11. 2009.
- Gonzalez, C. D., Lee, M. S., Marchetti, P., Pietropaolo, M., Towns, R., Vaccaro, M. I., Watada, H., Wiley, J. W. (2011). The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*, 7, 2-11.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R., Cossart, P. (1996). E-Cadherin Is the Receptor for Internalin , a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells. v. 84.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., & Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, 119, 753-766.
- Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K. (2011). Regulation of *Listeria* virulence : PrfA master and commander. *Current opinion in Microbiology*. v. 14.
- Hussey, S., Travassos, L. H., & Jones, N. L. (2009). Autophagy as an emerging dimension to adaptive and innate immunity. In *Seminars in immunology*, 21, 233-241
- Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y. S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., ... Komatsu, M. (2008). Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 22847-22857.
- Into, T., Inomata, M., Takayama, E., & Takigawa, T. (2012). Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cellular signalling*, 24, 1150-1162.
- Ivanov, S. S., & Roy, C. R. (2009). Modulation of ubiquitin dynamics and suppression of DALIS formation by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Cellular microbiology*, 11, 261-278.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V. C., Lill, J. R., Ashkenazi, A. (2009). Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*, 137, 721-735.
- Kelesidis, T., Salhotra, A., Fleishner, J., Uslan, D.. *Listeria* endocarditis in a patient with psoriatic arthritis on infliximab : Are biologic agents as treatment for inflammatory arthritis increasing the incidence of *Listeria* infections? *Journal of Infection*, v. 60, n. 5. 2010.
- Kleemann, P., Domann, E., Chakraborty, T., Bernstein, I., Lohoff, M.. Case Report Chronic prosthetic joint infection caused by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Medical Microbiology*. v. 58 .2017.
- Knodler, L. A., Celli, J. (2011). Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cellular microbiology*, 13, 1319-1327.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., & Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, 68, 521-531.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., ... Hamazaki, J. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131, 1149-1163.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., ... Kim, M. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology*, 12, 213-223.
- Lelouard, H., Gatti, E., Cappello, F., Gresser, O., Camosseto, V., Pierre, P. (2002). Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature*, 417, 177-182.
- Lelouard, H., Ferrand, V., Marguet, D., Bania, J., Camosseto, V., David, A., ... & Pierre, P. (2004). Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *The Journal of cell biology*, 164, 667-675.
- Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- Lim, J., Lachenmayer, M. L., Wu, S., Liu, W., Kundu, M., Wang, R., ... Yue, Z. (2015). Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates. *PLoS genetics*, 11.
- Smith, G. A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N. C., Portnoy, D. A., & Goldfine, H. (1995). The two distinct

phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infection and immunity*, 63, 4231-4237.

McLaughlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W., Jewell, K.. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*. v. 92, 2004.

Mildenberger, J., Johansson, I., Sergin, I., Kjøbli, E., Damås, J. K., Razani, B., ... Bjørkøy, G. (2017). N-3 PUFAs induce inflammatory tolerance by formation of KEAP1-containing SQSTM1/p62-bodies and activation of NFE2L2. *Autophagy*, 13, 1664-1678.

Mizushima, N., Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147, 728-741.

Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology*, 29, 407-439.

Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., Yoshimori, T. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science*, 306, 1037-1040.

Nihira, K., Miki, Y., Ono, K., Suzuki, T., Sasano, H. (2014). An inhibition of p62/SQSTM1 caused autophagic cell death of several human carcinoma cells. *Cancer science*, 105, 568-575.

Orenstein, S. J., Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. In *Seminars in cell & developmental biology*, 21., 719-726.

Orsi, R.; Wiedmann, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 2009, p. 5273–5287, 2016.

Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., & Münz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 307, 593-596.

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., ... Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 24131-24145.

Pillich, H., Chakraborty, T., & Mraheil, M. A. (2015). Cell-autonomous responses in *Listeria monocytogenes* infection. *Future microbiology*, 10, 583-597.

Pirie, J. (1927). Rodent ulcer. *The Canadian medical association journal*, 17.

Pirie, J. H. (1940). *Listeria*: Change of Name for a Genus of Bacteria. *Nature*, 145.

Puissant, A., Fenouille, N., Auberger, P. (2012). When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *American journal of cancer research*, 2, 397.

Rajabian, T., Gavicherla, B., Heisig, M., Müller-Altrock, S., Goebel, W., Gray-Owen, S. D., & Ireton, K. (2009). The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nature cell biology*, 11, 1212-1218.

Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., Kirkin, V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Molecular cell*, 53, 167-178.

Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental cell*, 20, 131-139.

Mesquita, F. S., Thomas, M., Sachse, M., Santos, A. J., Figueira, R., Holden, D. W. (2012). The *Salmonella* deubiquitinase SseL inhibits selective autophagy of cytosolic aggregates. *PLoS pathogens*, 8.

Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K. (2000). InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell*. v. 103.

Stępkowski, T. M., Kruszewski, M. K. (2011). Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 1186-1195.

- Szeto, J., Kaniuk, N. A., Canadien, V., Nisman, R., Mizushima, N., Yoshimori, T., ... Brumell, J. H. (2006). ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy*, 2, 189-199.
- Vasconcellos, L. R., Dutra, F. F., Siqueira, M. S., Paula-Neto, H. A., Dahan, J., Kiarely, E., Carneiro, L. A. M., Bozza, M. T., Travassos, L. H. (2016). Protein aggregation as a cellular response to oxidative stress induced by heme and iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113.
- Verlhac, P., Grégoire, I. P., Azocar, O., Petkova, D. S., Baguet, J., Viret, C., & Faure, M. (2015). Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell host & microbe*, 17, 515-525.
- Viala, J. P., Mochegova, S. N., Meyer- Morse, N., Portnoy, D. A. (2008). A bacterial pore- forming toxin forms aggregates in cells that resemble those associated with neurodegenerative diseases. *Cellular microbiology*, 10, 985-993.
- Watanabe, Y., Tanaka, M. (2011). p62/SQSTM1 in autophagic clearance of a non-ubiquitylated substrate. *J Cell Sci*, 124, 2692-2701.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., & Mitchison, T. J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, 281(5373), 105-108.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., Bakker, H. *Listeria booriae* sp . nov . and *Listeria newyorkensis* sp . nov ., from food processing environments in the USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* n.65, p. 286–292.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., ... Dötsch, V. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science*, 333, 228-233.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., ... & Kakizuka, A. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nature cell biology*, 11, 1233-1240.