

DAIANE MARIA CERQUEIRA

**O papel das proteínas ligadoras de guanilato
(GBP) na ativação de caspase-11 e gasdermina-D
(GSDMD) no controle da infecção causada pela
bactéria *Brucella abortus***

**Belo Horizonte,
Minas Gerais – Brasil
Abril – 2019**

DAIANE MARIA CERQUEIRA

**O papel das proteínas ligadoras de guanilato
(GBP) na ativação de caspase-11 e gasdermina-D
(GSDMD) no controle da infecção causada pela
bactéria *Brucella abortus***

Orientador: Dr. Sergio Costa Oliveira

Co-orientador: Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes

**Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica e Imunologia.**

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Abril - 2019



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DAIANE MARIA CERQUEIRA. Aos vinte e seis dias do mês de abril de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O papel das proteínas ligadoras de guanilato (GBP) na ativação de caspase-11 e gasdermina-D (GSDMD) no controle da infecção causada pela bactéria *Brucella abortus*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Andre Bafica (Universidade Federal de Santa Catarina), aprovada; Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira (Universidade Estadual de Campinas), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de abril de 2019.


 Dr. Andre Bafica (Universidade Federal de Santa Catarina)


 Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira (Universidade Estadual de Campinas)


 Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)


 Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)


 Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes - Coorientador (UFMG)


 Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)


 Prof. Leda Quêrcia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - 31270-901

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha querida mãe por ter sido a pessoa que mais acreditou em mim em toda a minha caminhada. Por ter aberto mão de tanta coisa para que os meus sonhos pudessem se tornar realidade. Por toda a torcida ao longo desses anos, pelas orações e pelo apoio incondicional em todos os momentos. Com certeza, tudo isso fez muita diferença na minha trajetória e sem isso eu não teria chegado até aqui.

Muito obrigada! Te amo muito!

Agradecimentos

A Deus por todas as bênçãos que Ele me concedeu nesses 4 anos de doutorado. O Seu cuidado foi sempre visível mesmo nas mínimas coisas. Obrigada pelas inúmeras portas abertas ao longo de toda minha vida e por me dar forças nessa caminhada.

Ao meu orientador Sergio Costa Oliveira por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e executar esse trabalho. Obrigada pela confiança, oportunidade de crescimento acadêmico e pelos conhecimentos que tive a chance de adquirir.

Ao meu co-orientador Marco Túlio por ser um co-orientador presente, pela parceria nos experimentos, pelos ensinamentos, sugestões de experimentos, pela atenção a mim dedicada, pelas correções de artigo, resumos e trabalhos, por estar sempre disponível para trocar conhecimentos comigo e me ajudar a refletir sobre os resultados e sobre a literatura. Sua ajuda foi fundamental nesse processo para mim! Muito obrigada!

Aos meus colegas de trabalho, Natan, Erika, Marcella e Suellen que contribuíram para que esse trabalho se estabelecesse e chegasse ao fim com sucesso. Cada um de vocês me ajudou muito! Muito obrigada pelos dias que ficaram até tarde no laboratório comigo, por às vezes chegarem bem cedo, virem até mesmo em dia de recesso para me ajudar nos meus experimentos! Agradeço também à Priscila que me ajudou na confecção de todas as figuras do trabalho e do modelo e também pelas infecções que me ajudou a fazer! Muito obrigada!

Aos demais lidianos atuais e que já finalizaram suas etapas no LIDI pela amizade, momentos de descontração no laboratório, pelas ajudas e ensinamentos constantes. À Sandra pelo apoio, amizade e dedicação ao seu trabalho, o que facilita e propicia que possamos fazer os nossos experimentos com sucesso e sem nunca faltar nada! Ao Iuri e Rosania pelo trabalho junto ao biotério, o qual é fundamental para a execução adequada de nossos experimentos. Muito obrigada.

Ao meu colaborador Alexandre Neves por, assim como foi no meu mestrado, ter me ajudado na execução de diversos experimentos, por ter dedicado seu tempo para me ajudar todas as vezes que fui a Ribeirão Preto, por ter se disposto a aprender a trabalhar com *Brucella* para me auxiliar mesmo depois que eu não pude mais ir a RP fazer os experimentos que faltaram, pelas ideias, sugestões, discussões e dicas que com certeza contribuíram para o sucesso do trabalho. Ao Prof. Dario Zamboni, pela colaboração nesse

trabalho, por ceder seu aluno, espaço físico e equipamentos para a execução dos meus experimentos.

À minha mãe pelo apoio constante na minha vida acadêmica, pelas orações, por me acompanhar ao laboratório à noite e no final de semana algumas vezes que precisei mesmo tendo que vir a pé, pelo amor e cuidado comigo e pelos momentos felizes que sempre vivemos juntas. Você é mais que uma mãe, é uma parceira de vida que Deus me deu! Ao meu pai (*in memoriam*) que mesmo não estando mais presente, me ensinou muito sobre a vida, sobre dedicação e esforço em tudo o que se propõe a fazer. Com certeza esses ensinamentos contribuíram muito para o que eu sou hoje e ficarão guardados para sempre em minha vida.

Ao meu noivo, pelo apoio, paciência e parceria. Por estar sempre ouvindo minhas reclamações e histórias sobre caspase-11, gasdermina e camundongos mesmo sem entender nada disso. Por vir comigo várias vezes no laboratório de carro ou a pé, seja dia ou noite, muitas vezes no domingo, e ficar ali aguardando eu fazer os experimentos sem nunca reclamar ou ficar me apressando. Você facilitou essa etapa para mim! Você sabe o quanto eu amo a sua companhia e agradeço por estar ao meu lado sempre disposto a fazer algo legal seja para distrair em um dia ruim ou para comemorar nas vitórias. Eu te amo muito, você me faz feliz!

Aos meus colegas da Escola de Veterinária que surgiram como um presente no meio dessa etapa. Vocês ouvem minhas reclamações, assistem meus ensaios de seminários mesmo sem entender do tema, me divertem e são parceiros. Nem vou listar os nomes, porque com certeza acabaria esquecendo alguém. Muito obrigada a todos! Aos Profs. Último e Lobão por serem os melhores chefes que eu poderia ter na minha vida. Pelos sábios conselhos, conversas, comidinhas gostosas, cafezinho quentinho e amoroso todo dia e principalmente pela amizade! Vocês são pessoas especiais, dedicadas e que amam o que fazem, e por isso eu aprendo muito com vocês todos os dias!

Às minhas colegas de república, Olívia, Gabi, Cláudia e nesse finalzinho, a Carol, ao lado das quais convivi esses anos. Obrigada pelo companheirismo! Aos demais amigos de BH e Barbacena e a todos os familiares que mesmo distantes, sempre torceram por mim, muito obrigada!

Aos demais professores da UFMG, à UFMG e às agências de fomento que contribuem para a concretização do nosso trabalho! Muito obrigada a todos!

Resumo

Brucella abortus é uma bactéria Gram-negativa que causa uma doença conhecida como brucelose. A resposta imune inata contra essa bactéria envolve a ativação de receptores do tipo Toll (TLRs – do inglês “Toll like receptors”) e do tipo NOD (NLRs – do inglês “NOD like receptors”). Nesse trabalho demonstramos que *B. abortus* desencadeia a ativação do inflamassoma não-canônico dependente de caspase-11 e gasdermina-D (GSDMD). Além disso, identificamos que o LPS de *B. abortus* atua como o padrão molecular associado a patógenos (PAMP – do inglês “Pathogen-associated molecular pattern”) responsável pela ativação de caspase-11. Observamos que *B. abortus* é capaz de desencadear a formação de poros e a morte celular pelo processo de piroptose, e este processo é dependente de caspase-11 e GSDMD. Camundongos deficientes em caspase-11 ou GSDMD foram mais suscetíveis à infecção por *B. abortus* em comparação com os deficientes em caspase-1 ou selvagens. Além disso, observamos que as proteínas ligadoras de guanilato (GBPs – do inglês “Guanylate-binding proteins”) participam do reconhecimento do LPS por caspase-11, contribuindo para a ativação do inflamassoma não-canônico. A partir do silenciamento por siRNA dos GBPs, determinamos que os GBPs 4 e 5 são os mais importantes para o reconhecimento do LPS de *B. abortus* por caspase-11. Além disso, observamos redução no influxo de neutrófilos, células dendríticas e macrófagos nos baços de animais *Casp11^{-/-}* e *Gsdmd^{-/-}* em comparação com camundongos selvagens, sugerindo que caspase-11 e GSDMD estão envolvidas no recrutamento e ativação de células imunes inatas durante a infecção por *B. abortus*. Por fim, a depleção de neutrófilos em camundongos selvagens levou a uma maior suscetibilidade à infecção por *B. abortus*. Coletivamente, estes dados sugerem que a piroptose dependente de caspase-11/GSDMD desencadeada por *B. abortus* é importante para a restrição da infecção *in vivo* e contribui para o recrutamento e ativação de células imunes.

Abstract

Brucella abortus is a Gram-negative bacterium that causes a disease in humans and cattle termed brucellosis. Innate immune response against *Brucella abortus* involves activation of Toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors (NLRs). Among the NLRs involved in the recognition of *B. abortus* are NLRP3 and AIM2. Here, we demonstrate that *B. abortus* triggers non-canonical inflammasome activation dependent on caspase-11 and gasdermin-D (GSDMD). Additionally, we identify that *Brucella*-LPS is the ligand for caspase-11 activation. Interestingly, we determine that *B. abortus* is able to trigger pyroptosis leading to pore formation and cell death, and this process is dependent on caspase-11 and GSDMD but independently of caspase-1 protease activity and NLRP3. Mice lacking either caspase-11 or GSDMD were significantly more susceptible to infection with *B. abortus* than caspase-1 knockout or wild-type animals. Additionally, guanylate-binding proteins (GBPs) participate in the recognition of LPS by caspase-11 contributing to non-canonical inflammasome activation. We further determined by siRNA knockdown that among the GBPs, GBP4 and GBP5 are the most important for *Brucella* LPS to be recognized by caspase-11 triggering IL-1 β secretion and LDH release. Additionally, we observed a reduction in neutrophil, dendritic cell and macrophage influx in spleens of *Casp11*^{-/-} and *Gsdmd*^{-/-} compared to wild-type mice, indicating that caspase-11 and GSDMD are implicated in the recruitment and activation of immune cells during *Brucella* infection. Finally, depletion of neutrophils renders wild-type mice more susceptible to *Brucella* infection. Taken together, these data suggest that caspase-11/GSDMD-dependent pyroptosis triggered by *B. abortus* is important to infection restriction *in vivo* and contributes to immune cell recruitment and activation.

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura geral do LPS de bactérias Gram-negativas. Adaptado de (Erridge et al., 2002).....	19
Figura 2: Tráfego intracelular de <i>Brucella</i> em células de mamíferos (Celli, 2015).....	21
Figura 3: A via de sinalização do inflamassoma. Adaptado de (Coll et al., 2016).	27
Figura 4: Bases moleculares da ativação do inflamassoma não-canônico levando à piroptose e restrição de infecções bacterianas. (Gomes et al., 2019)	46
Figura 5: Genotipagem dos animais <i>Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}</i>	65
Figura 6: A produção de IL-1 β em resposta a <i>B. abortus</i> é dependente de NLRP3, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV.	68
Figura 7: A ativação de caspase-1 em resposta a <i>B. abortus</i> é dependente de NLRP3, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV.	71
Figura 8: A transfecção do LPS de <i>B. abortus</i> desencadeia a produção de IL-1 β e ativação de caspase-1 de maneira dependente de NLRP3 e caspase-11.....	74
Figura 9: A piroptose em resposta a <i>B. abortus</i> é dependente de caspase-11, mas independente de NLRP3 e caspase-1.....	77
Figura 10: A secreção de IL-1 α em resposta a <i>B. abortus</i> é dependente de caspase-11, mas independente de NLRP3 e caspase-1.	78
Figura 11: A piroptose e a ativação de caspase-11 em resposta a <i>B. abortus</i> são dependentes dos GBPs do cromossomo 3.	81
Figura 12: O LPS de <i>B. abortus</i> ativa caspase-11 e desencadeia a piroptose de maneira dependente de proteínas ligadoras de guanilato (GBPs).	83
Figura 13: Expressão de proteínas ligadoras de guanilato (GBPs) em BMDMs.	85
Figura 14: GBP4 e GBP5 são requeridas para secreção de IL-1 β e liberação de LDH em resposta ao LPS de <i>B. abortus</i>	85

Figura 15: A Gasdermina-D (GSDMD) é requerida para induzir o processo de piroptose em resposta à infecção por <i>B. abortus</i>	90
Figura 16: Caspase-11 e Gasdermina-D (GSDMD) são importantes para o efluxo de K ⁺ e ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta a <i>B. abortus</i>	91
Figura 17: A caspase-11, mas não caspase-1 e NLRP3, é requerida para o controle da infecção de <i>B. abortus</i> em camundongos, mas não em macrófagos..	93
Figura 18: Caspase-11 e GSDMD são requeridas para o controle da infecção <i>in vivo</i> , mas são dispensáveis para a restrição da replicação de <i>B. abortus</i> em macrófagos.	94
Figura 19: Camundongos deficientes em IL-1 α não mostraram aumento da carga bacteriana após a infecção por <i>B. abortus</i> quando comparados a animais do tipo selvagem.	95
Figura 20: A GSDMD regula o recrutamento de células imunes inatas.	98
Figura 21: Produção de KC em resposta à infecção por <i>B. abortus</i> em baço de camundongos.....	99
Figura 22: Expressão de IL-17 em células Ly6G ⁺ de baço de camundongos infectados por <i>B. abortus</i>	99
Figura 23: Camundongos selvagens tratados com anti-Ly6G são mais suscetíveis à infecção por <i>B. abortus</i>	100
Figura 24: Modelo esquemático proposto para ativação do inflamassoma não-canônico em resposta à infecção por <i>B. abortus</i>	107

Lista de tabelas

Tabela 1: Primers utilizados na PCR em tempo real.....	59
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

AIM2: *Absent in melanoma 2*

ASC: *Apoptosis-Associated Speck-like protein containing a caspase recruitment domain*

APCs: células apresentadoras de antígenos

ATG5: *Autophagy related 5*

ATP: Adenosina trifosfato

ANOVA: Análise de variância

BAC: cromossomo artificial bacteriano

BB: *Brucella Broth*

BCV: Vacúolo contendo *Brucella*

BIR: *Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*

BMDM: Macrófagos derivados de medula óssea

BSA: Albumina sérica bovina

CARD: *Caspase recruitment domain*

CD: cluster de diferenciação

CTB: *Cholera Toxin B subunit*

CIITA: *Class II, major histocompatibility complex, Transactivator*

DAMP: Padrão Molecular Associado ao Dano

DMEM: Meio *Dulbecco's Modified Eagle's*

DNA: Ácido Desoxiribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiamina tetracético

EEA1: *Early Endosomal Antigen 1*

ELISA: Ensaio Imunoenzimático de Adsorção

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

ERES: sítios de saída do retículo endoplasmático

ESCRT: *Endosomal sorting complexes required for transport*

GBP: *Guanylate-binding protein*

GSDM: *Gasdermin*

HEPES: *N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid*

HIN200: *hemopoietic IFN-inducible nuclear protein 200-amino acid motif*

HRP: *Horse radish peroxidase*

IFN: Interferon

IL: Interleucina

i.p: intraperitoneal
IRE1 α : *inositol-requiring enzyme 1 alpha*
IRF: *Interferon regulatory factor*
IRGB10: *Immunity-related GTPase family member b10*
i.v.: intravenoso
KC: *Keratinocyte chemoattractant*
LAMP1: *Lysosomal Associated Membrane Protein 1*
LCCM: Meio Condicionado de células L929
LDH: lactato desidrogenase
LPS: Lipopolissacarídeo
LRR: *Leucine-Rich Repeat*
MFI: intensidade mediana de fluorescência
M-PER: *Mammalian Protein Extraction Reagent*
MOI: Multiplicidade de infecção
MPO: mieloperoxidase
MyD88: *Myeloid differentiation primary response protein (88)*
min: minutes
ml: mililitros
NAIP5: *NLR family, apoptosis inhibitory protein 5*
NE: elastase de neutrófilos
NET: *Neutrophil extracellular traps*
NF κ B: *Nuclear factor kappa B*
NI: Não Infectado
NLR: *Nod-Like Receptor*
NLRC4: *NLR family, CARD domain containing 4*
NLRP: *NLR family, Pyrin domain containing*
NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain*
OMV: *Bacterial outer membrane vesicles*
PAMP: Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBS: Salina Tamponada com Fosfato
PCR: reação em cadeia da polimerase
PCV: vacúolo contendo patógeno
PI: Iodeto de Propídio
PIT: *Pore-induced traps*

PJVK: *Pejvakin*

PMSF: *phenylmethanesulfonyl fluoride*

PRR: Receptor de Reconhecimento Padrão

RE: retículo endoplasmático

RFU: *Relative fluorescence units*

RIPA: tampão de ensaio de radioimunoprecipitação

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT-PCR: *Real-time PCR*

SBF: Soro Bovino Fetal

SD: desvio padrão

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TAK1: *TGF- β activated kinase 1*

TCRD: *T-cell receptor delta chain*

TLR: Receptor do Tipo Toll

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TfR: receptor da transferrina

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

U: Unidades

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UPR: resposta a proteínas mal enoveladas

WT: Selvagem (*Wild-type*)

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de figuras	9
Lista de tabelas	11
Lista de abreviaturas e siglas	12
1- Introdução.....	18
1.1 – O gênero <i>Brucella</i>	18
1.1.1 – Brucelose.....	20
1.1.2- Patogênese e ciclo replicativo de <i>B. abortus</i>	20
1.2 – Receptores de reconhecimento de padrões: TLRs e NLRs.....	24
1.3 – Inflamassomas.....	26
1.3.1 – O inflamassoma de AIM2.....	27
1.3.2 – O inflamassoma de NLRP1	28
1.3.3 – O inflamassoma de NLRC4	29
1.3.4 – O inflamassoma de NLRP3	30
1.3.5 – O inflamassoma não-canônico de caspase-11.....	32
1.3.5.1 – As proteínas ligadoras de guanilato – GBPs.....	35
1.3.5.2 – A piroptose dependente da gasdermina	40
1.4 – A resposta imune inata frente à infecção por <i>B. abortus</i>	46
2- Justificativa.....	48
3- Objetivos	50
3.1 – Objetivo Geral.....	50
3.2 – Objetivos Específicos.....	50
4- Material e métodos	51
4.1 – Bactérias.....	51
4.2 – Animais	51
4.3 – Declaração de ética	52
4.4 – Genotipagem de camundongos <i>Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}</i>	52
4.5 – Preparo de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)	52

4.6 – Transfecção de LPS de <i>B. abortus</i> em BMDMs.....	53
4.7 – Ensaio de formação de poro e geração de anticorpo.....	53
4.8 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas.....	54
4.9 – Ensaio de liberação de lactato desidrogenase	55
4.10 – Curvas de crescimento de <i>B. abortus</i> em BMDMs.....	56
4.11 – Curvas de crescimento de <i>B. abortus in vivo</i>	56
4.11 – Ensaio de <i>pull-down</i> para caspase-11 ativa	56
4.12 – Western Blottings.....	57
4.13 – PCR em tempo real	58
4.14 – Silenciamento com siRNA.....	60
4.15: Análise de citometria de fluxo	60
4.16: Microscopia confocal.....	61
4.17: Ensaio de aumento extracelular de $[K^+]$ e quantificação do efluxo de K^+	62
4.18: Depleção de neutrófilos	63
4.19 – Análise estatística.....	63
5- Resultados	64
5.1 – A produção de IL-1 β e a ativação de caspase-1 em resposta a <i>B. abortus</i> são dependentes de NLRP3, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV	64
5.2 – A transfecção do LPS de <i>B. abortus</i> leva à produção de IL-1 β e ativação de caspase-1 de maneira dependente de NLRP3 e caspase-11	72
5.3 – <i>B. abortus</i> selvagem leva à piroptose e secreção de IL-1 α em BMDMs de maneira dependente de caspase-11 e independente de caspase-1 e NLRP3.....	74
5.4 – As proteínas ligadoras de guanilato (GBPs) são requeridas para a piroptose e ativação de caspase-11 em resposta a <i>B. abortus</i>	78
5.5 – Gasdermina-D é fundamental para induzir a piroptose e ativar o inflamassoma de NLRP3 em resposta a <i>B. abortus</i>	86
5.6 – GSDMD e caspase-11 são essenciais para o controle da infecção por <i>B. abortus</i> e regulam o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas	92
6 – Discussão	101
7 – Considerações finais.....	108
8 – Referências bibliográficas	109
9 – Anexos	124
9.1 – Artigos publicados durante o período do doutorado.....	124

9.2 – Artigo principal gerado a partir desse trabalho.....	124
--	-----

1- Introdução

1.1 – O gênero *Brucella*

O gênero *Brucella* compreende bactérias Gram-negativas, que apresentam formato de coco-bacilos ou de pequenos bastões, são intracelulares facultativas, não móveis e não esporogênicas (Percin, 2013). Essa bactéria foi descrita primeiramente em 1887 pelo cirurgião do exército britânico David Bruce, o qual isolou um coco-bacilo nomeado por ele como “*Micrococcus melitensis*” a partir do baço de um homem que morreu de febre de Malta, nome pelo qual a doença também é conhecida em humanos (Bruce, 1887; Corbel, 1997; Wyatt, 2009).

Atualmente, o gênero *Brucella* compreende 10 espécies tais como *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, dentre outras, sendo que cada espécie apresenta preferência por um diferente hospedeiro (Corbel, 1997; Percin, 2013). As espécies *B. abortus*, *B. suis* e especialmente *B. melitensis* são capazes de infectar humanos causando uma doença conhecida como brucelose (De Bolle et al., 2015).

As bactérias do gênero *Brucella* podem ser classificadas em lisas e rugosas. Essa classificação está relacionada à estrutura de seu LPS. Isso influencia diretamente em sua virulência, uma vez que as bactérias lisas são virulentas, ao passo que as rugosas possuem alto poder vacinal devido à sua menor virulência ou até mesmo avirulência (Rittig et al., 2003). O LPS de *Brucella*, assim como o LPS de outras bactérias Gram-negativas, é constituído de três regiões: (i) o lipídeo A altamente hidrofóbico na membrana mais externa com uma extensão de polissacarídeo hidrofílica consistindo de (ii) um oligossacarídeo central e (iii) subunidades sacarídicas repetidas ligadas conhecidas como polissacarídeo O ou cadeia O (Fig. 1) (Caroff et al., 2002; Erridge et al., 2002). Entretanto,

no caso das bactérias rugosas, seu LPS possui a cadeia O expressa em uma forma truncada não repetitiva conhecida como LPS rugoso ou lipo-oligossacarídeo. Dessa forma, o LPS dessas bactérias possui a cadeia O reduzida ou até mesmo ausente. Já o LPS das bactérias lisas apresenta a cadeia O completa (Caroff et al., 2002; Erridge et al., 2002). As formas rugosas surgem espontaneamente a partir das lisas em cultura (Smith and Ficht, 1990). As principais bactérias, as quais são patogênicas em humanos, *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* são virulentas em sua forma lisa e não ou pouco virulentas em sua forma rugosa. Dessa forma, o LPS é um fator chave na patogenicidade da brucelose humana (Sangari and Agüero, 1996). Outra porção do LPS cujas modificações podem influenciar na virulência da bactéria é o lipídeo A do LPS. Diferente do observado na maioria das bactérias Gram-negativas, as caudas de ácido graxo presentes no LPS de *B. abortus* são mais longas, o que diminui suas propriedades endotóxicas, visto que essas cadeias longas não são eficientemente reconhecidas por TLR4 (Tsolis et al., 2008). Dessa forma, as modificações das cadeias de ácido graxo atuam como uma estratégia de tentativa de evasão do sistema imune pelas bactérias. Quanto ao grau de acilação dessas cadeias de ácidos graxos dos lipídeos A, o LPS de *B. abortus* ocorre principalmente na forma hexa-acilada (Lapaque et al., 2006; Tsolis et al., 2008).

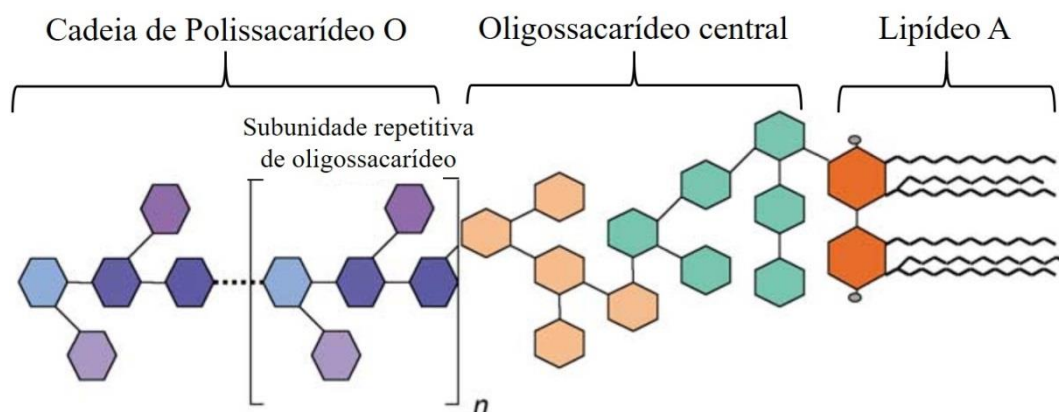


Figura 1: Estrutura geral do LPS de bactérias Gram-negativas. Adaptado de (Erridge et al., 2002).

1.1.1 – Brucelose

A brucelose é também conhecida como febre de Malta, febre do mediterrâneo ou febre ondulante. Essa doença é considerada uma das infecções zoonóticas mais difundidas pelo mundo (Boschioli et al., 2001). A brucelose bovina é causada pela espécie *Brucella abortus* e é a forma mais propagada da doença (Corbel, 1997). *B. abortus* é capaz de infectar tanto bovinos quanto humanos de qualquer idade e sexo, sendo que em humanos a principal forma de contágio é através da ingestão de derivados do leite ou contato com animais contaminados (De Bolle et al., 2015). Em humanos, podem ser observadas manifestações patológicas tais como febre ondulante, artrite, endocardite, meningite e osteomielite. Ao passo que em bovinos, *B. abortus* leva ao aborto e à infertilidade resultando em severas perdas econômicas (Deka et al., 2018; Franc et al., 2018; Santos et al., 2013).

1.1.2- Patogênese e ciclo replicativo de *B. abortus*

No início da infecção no hospedeiro, as bactérias do gênero *Brucella* infectam primariamente células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como células dendríticas e macrófagos (Archambaud et al., 2010; Celli, 2015). Esses fagócitos profissionais atuam tanto como um nicho replicativo inicial quanto no auxílio da disseminação sistêmica desse patógeno, o qual posteriormente infecta células da linhagem mieloide como macrófagos do fígado e baço, além de permanecer em lesões granulomatosas e ser capaz de infectar e proliferar em trofoblastos da placenta de fêmeas grávidas (Atluri et al., 2011).

Uma vez no interior das células, *B. abortus* possui um ciclo replicativo intracelular sofisticado marcado pela subversão das vias normais de tráfego intracelular e estabelecimento de um nicho replicativo no interior dos fagócitos (Celli, 2015). Essa

bactéria reside em um compartimento membranoso no interior das células conhecido como BCV (Vacúolo contendo *Brucella* – do inglês “*Brucella* containing vacuole”). Esse BCV interage com outros componentes celulares como endossomos, lisossomos e retículo endoplasmático sofrendo diversas modificações, e, portanto passa por diferentes estágios conhecidos como eBCV (BCV endossomal), rBCV (BCV replicativo) e por fim aBCV (BCV relacionado à autofagia) (Fig. 2) (Celli, 2015; Celli et al., 2003; Comerci et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998a; Pizarro-Cerda et al., 1998b; Starr et al., 2008).

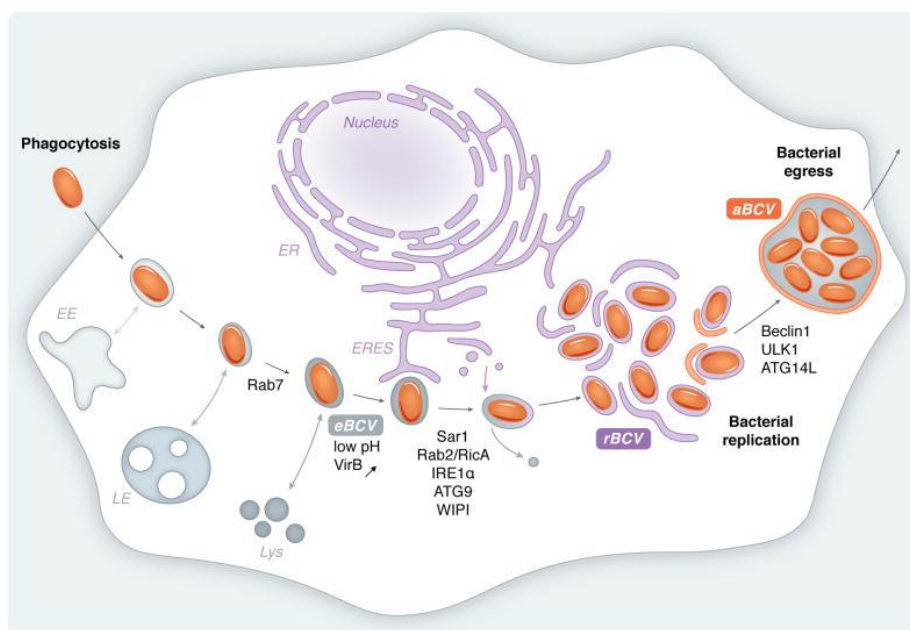


Figura 2: Tráfego intracelular de *Brucella* em células de mamíferos (Celli, 2015).

Inicialmente, o BCV interage com endossomos primários, sendo essa interação comprovada pela presença de marcadores tais como Rab5, seu efetor EEA1 e o receptor de transferrina TfR (Bellaire et al., 2005; Celli et al., 2003; Comerci et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998a; Pizarro-Cerda et al., 1998b; Starr et al., 2008). Após essa interação transiente, o BCV interage com endossomos tardios e lisossomos sendo marcado pela presença de LAMP1, CD63 e Rab7 (Bellaire et al., 2005; Celli et al., 2003; Starr et al., 2008), além de posterior rápida acidificação com pH entre 4 e 4,5 (Boschiroli et al., 2002;

Porte et al., 1999; Starr et al., 2008). Embora essa fusão com lisossomos ocorra em uma menor extensão se comparada a vacúolos contendo partículas inertes, esse processo de fato ocorre, visto que é possível observar um enriquecimento de marcadores endossomais tardios/lisossomais no eBCV maduro, além da rápida acidificação (Starr et al., 2008). Apesar de essa acidificação levar uma parcela das bactérias à morte (Celli et al., 2003), ela é fundamental para a indução do sistema de secreção do tipo IV *virB* (T4SS) (Boschiroli et al., 2002; O'Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000). Esse sistema de secreção é responsável pela injeção de proteínas efetoras no citoplasma celular (Celli, 2015) e atua como o fator mais importante na virulência de *Brucella*, essencial para a biogênese e estabelecimento do rBCV e, dessa forma, sua replicação no interior celular (Celli et al., 2003; Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001). Trabalhos mostram que a acidificação é fundamental para o sucesso do estabelecimento do rBCV, uma vez que a inibição da fusão com endossomos tardios/lisossomos impede a formação dessa estrutura e a replicação intracelular (Starr et al., 2008).

A forma infecciosa de *B. abortus* está aprisionada na fase G1 do ciclo celular, porém ainda no eBCV, ela retoma o ciclo celular e a replicação cromossomal, sendo que geralmente, o início da divisão bacteriana ocorre após 6 h de infecção (Deghelt et al., 2014). A replicação de *B. abortus* ocorre primordialmente no rBCV, embora ela possa começar ainda no eBCV maduro (Celli, 2015; De Bolle et al., 2015). A formação do rBCV se dá pela fusão do eBCV maduro com cisternas do retículo endoplasmático, levando a uma transferência do vacúolo da via endocítica para a via secretória. O rBCV possui marcadores de retículo endoplasmático como a calreticulina (Starr et al., 2008). Nesse processo de transferência, o eBCV intercepta sítios de saída do retículo endoplasmático (ERES – do inglês “Endoplasmic reticulum exit sites”) para sua conversão em rBCV (Celli et al., 2005). Bactérias mutantes para o sistema de secreção

tipo IV *virB* são incapazes de realizar essas interações com os sítios de saída do retículo endoplasmático e, dessa forma, ficam aprisionadas no eBCV (Celli et al., 2003; Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001). Os efetores secretados via sistema de secreção atuam na modulação das funções do hospedeiro envolvidas na via secretória primária, a fim de gerar o rBCV (Celli, 2015). De fato, uma série de efetores que possuem como alvo compartimentos da via secretória primária ou que impedem o tráfego secretório já foram identificados através de estudos de expressão ectópica em células Hela (Myeni et al., 2013).

Recentemente, tem sido proposta uma relação entre autofagia e o processo de replicação de *B. abortus* (Pizarro-Cerda et al., 1998a; Pizarro-Cerda et al., 1998b). IRE1 α é um sensor transmembrana envolvido na via de resposta ao estresse no retículo conhecida como UPR (Resposta a proteínas mal enoveladas – Do inglês “Unfolded Protein Response”), cuja ativação tem como objetivo resolver o estresse no retículo e restaurar a homeostase celular. Uma dessas respostas é a indução de autofagia dependente de IRE1 α , a qual contribui no controle da expansão do retículo endoplasmático após a ativação da via UPR (Bernales et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006). Já foi demonstrado que IRE1 α é importante para a replicação de *B. abortus*, e dessa forma foi proposto que o papel de IRE1 α nesse processo seria a ativação da autofagia que então promoveria a conversão do eBCV em rBCV (Qin et al., 2008). Além disso, trabalhos mostram que IRE1 α é ativado cerca de 4 h após a infecção de células Hela por *B. abortus*, o que demonstra uma possível ativação da via UPR durante a fase do eBCV (Taguchi et al., 2015). Entretanto, esse dado necessita de mais investigações, uma vez que a deleção de outros componentes importantes no processo de autofagia como Beclin1, LC3B, ATG5 dentre outras moléculas não leva a uma inibição da conversão do eBCV em rBCV. (Starr et al., 2012). Portanto, a ativação de IRE1 α parece desencadear a formação de vesículas autofágicas de

uma maneira dependente de ATG9 e WIPI, que se fundem com o eBCV para promover a biogênese do rBCV por acúmulo de membranas derivadas do RE e exclusão de membranas endossômicas. As pequenas GTPases Sar1 e Rab2 (via sua interação com o efetor de *Brucella* RicA) são necessárias para a biogênese do rBCV e subsequente replicação bacteriana nos rBCVs (Celli, 2015). Dessa forma, *B. abortus* pode estar envolvida em um processo autofágico que difere da via canônica, através da subversão de um subconjunto de proteínas associadas a autofagia, a fim de promover um acréscimo de membranas derivadas do RE no eBCV, e assim sua conversão em rBCV (Celli, 2015). Após 48 h de infecção, foi possível observar em macrófagos e células epiteliais, a presença de *B. abortus* em estruturas multimembranares semelhantes aos autofagossomos que foram denominadas aBCVs (BCV autofágico) (Starr et al., 2012). Esse processo de conversão do rBCV em aBCV envolve as proteínas de iniciação autofágica Beclin1, ULK1 e ATG14L (Celli, 2015). Nessas estruturas, é possível observar a presença de características de endossomos tardios e não mais de marcadores de retículo endoplasmático, o que os torna semelhante aos autofagossomos em maturação (Starr et al., 2012). Dados obtidos em células Hela demonstraram a importância desses aBCVs na liberação de *B. abortus* da célula após a multiplicação e, dessa forma, sua disseminação para células vizinhas. Portanto, o aBCV parece ser fundamental na conclusão do ciclo intracelular de *B. abortus* (Starr et al., 2012).

1.2 – Receptores de reconhecimento de padrões: TLRs e NLRs

Uma vez que *Brucella abortus* entra em contato e infecta as células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas, ela é capaz de levar à ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – Do inglês “Pattern recognition

receptors”), tais como TLRs e NLRs (Marim et al., 2017a). Esses receptores podem ser ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e danos celulares (DAMPs).

Quando PAMPs como lipopolissacarídeos (LPS) e flagelina bacteriana entram em contato inicial com células tais como as APCs, é desencadeada a ativação de receptores do tipo Toll (TLRs – Do inglês “Toll Like receptors”). Esses receptores levam à ativação de vias, através de moléculas adaptadoras como MyD88 e TRIF, que culminam em ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e IRF3/IRF7 (O'Neill and Bowie, 2007). Esses fatores de transcrição controlam a expressão de moléculas como NLRP3, pró-IL-1 β , caspase-11 e interferon do tipo I (Bauernfeind et al., 2009; Kayagaki et al., 2013; Mariathasan, 2007; Schauvliege et al., 2002). No caso de *B. abortus* foi observado que essa bactéria é capaz de levar à ativação de TLR2 e TLR4 através das lipoproteínas da membrana externa, conhecidas como Omp16 e Omp19, levando à produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10 (Giambartolomei et al., 2004; Pasquevich et al., 2010). Além disso, TLR9 possui um papel importante no controle da infecção de *B. abortus*, sendo recentemente demonstrado o envolvimento de motivos CpG derivados do DNA dessa bactéria na resposta imune inata desencadeada por esse receptor (Gomes et al., 2016).

Os NLRs pertencem a uma grande família de PRRs e atuam na ativação da maioria dos inflamassomas. Eles possuem uma estrutura que contém três domínios distintos: na porção amino-terminal eles podem possuir um domínio de recrutamento de caspase (CARD), um domínio pirina (PYRIN) ou um domínio de *repetições* de inibição de baculovírus (BIR) que medeia interações proteína-proteína *downstream*; um domínio central de ligação de nucleotídeos e oligomerização (NOD ou NACHT); e um domínio carboxi-terminal de repetições de leucina (LRR) que atua como sensor de diferentes estímulos microbianos e danos endógenos (Franchi et al., 2012; Meylan et al., 2006).

Dessa forma, os NLRs compreendem duas grandes subfamílias: 14 membros da subfamília NLRP (NALP) e 5 membros da subfamília NOD, os quais contêm pirina e CARD (NOD5 não possui um domínio CARD típico), respectivamente na porção amino-terminal. Os membros restantes da grande família dos NLRs são: proteínas CIITA e NLRC4 (também conhecido como IPAF), as quais contêm CARD; e as proteínas NAIP que contêm BIR na porção amino-terminal (Meylan et al., 2006).

1.3 – Inflamassomas

Os inflamassomas são complexos citoplasmáticos multiproteicos que atuam como sensores de PAMPs e DAMPs (Fig. 3). Eles atuam como componentes chave da vigilância citosólica e controlam a ativação da enzima proteolítica caspase-1. A caspase-1 é responsável pela maturação das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18). Ela é uma cisteína protease aspartato-específica que cliva seus substratos, IL-1 β e IL-18, nos sítios de reconhecimento adjacentes aos resíduos de ácido aspártico. Além disso, caspase-1 atua na indução de uma rápida forma de morte celular inflamatória denominada de piroptose (Lamkanfi and Dixit, 2009; Rathinam et al., 2012a).

A atividade do inflamassoma requer dois sinais. Um primeiro sinal (*priming*), o qual aumenta a expressão de componentes do inflamassoma incluindo pró-IL-1 β , caspase-11, e NLRP3, e depois outro sinal que desencadeia a ativação de caspase (Bauernfeind et al., 2009; Kayagaki et al., 2011; Mariathasan, 2007; Mariathasan et al., 2006).

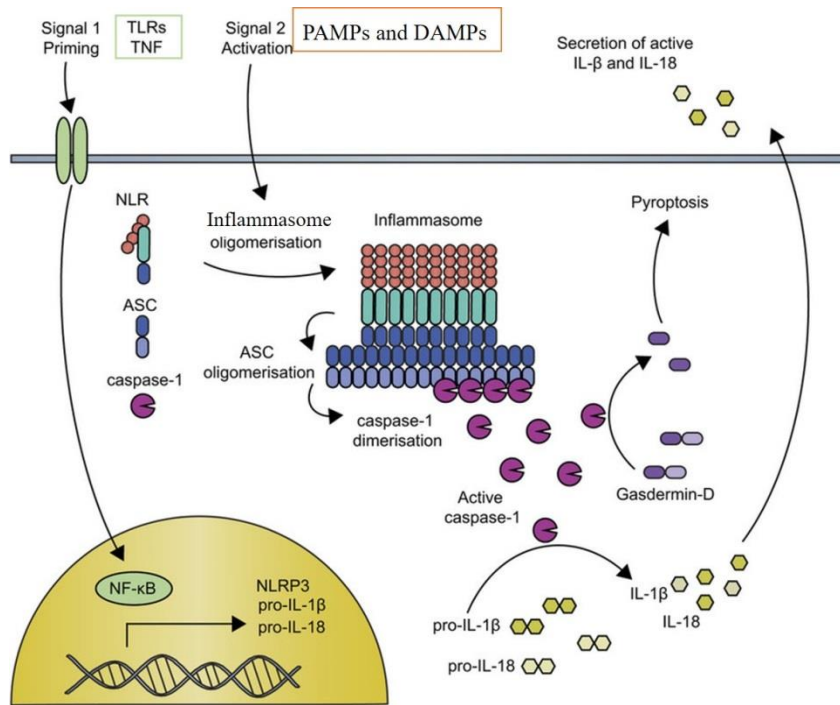


Figura 3: A via de sinalização do inflamassoma. Adaptado de (Coll et al., 2016).

Atualmente, existem diversos inflamassomas bem descritos, os quais possuem diferentes receptores de reconhecimento padrão participando do reconhecimento de produtos microbianos específicos, como por exemplo, os inflamassomas de NLRP1B, NLRP3, NLRC4 e AIM2. Entretanto, nem todos são capazes de reconhecer e serem ativados por *B. abortus*.

1.3.1 – O inflamassoma de AIM2

O inflamassoma de AIM2 é capaz de reconhecer DNA de dupla-fita no citosol da célula. O receptor que participa desse reconhecimento é a molécula AIM2 (do Inglês, “Absent in melanoma 2”), a qual apesar de atuar como um PRR não pertencente à família dos NLRs. AIM2 é membro da família PYHIN que possui um domínio N-terminal pirina e um domínio C-terminal conhecido como HIN-200, o qual é capaz de reconhecer DNA de dupla-fita, ao qual se liga e oligomeriza, formando um grande complexo de

inflamassoma (Broz and Dixit, 2016; Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009). Uma vez completamente montada, essa plataforma molecular recruta a proteína adaptadora ASC (do Inglês, “Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD”), facilitando sua oligomerização em um grande complexo conhecido como piroptossomo. Esse piroptossomo leva à ativação de caspase-1, culminando na maturação e secreção de IL-1 β e IL-18, e posterior morte celular por piroptose (Fernandes-Alnemri et al., 2007; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Srinivasula et al., 2002). Esse receptor possui importância no reconhecimento de DNA viral, tal como de citomegalovírus e vírus de vaccínia, e em infecções bacterianas como a de *Francisella tularensis* subsp novicida e *Listeria monocytogenes* sendo que nesse caso a ativação requer a lise bacteriana no citosol da célula (Fernandes-Alnemri et al., 2010; Jones et al., 2010; Rathinam et al., 2010; Sauer et al., 2010). Além disso, trabalhos demonstram que o DNA de *B. abortus* também é capaz de ser reconhecido por AIM2, e dessa forma, AIM2 parece possuir papel no controle da infecção por *B. abortus* (Gomes et al., 2013; Marim et al., 2017a).

1.3.2 – O inflamassoma de NLRP1

Outro importante inflamassoma é o de NLRP1 humano, o qual foi o primeiro inflamassoma ativador de caspase-1 a ser identificado (Martinon et al., 2002). Ao contrário de humanos, que possuem um único gene *NLRP1*, camundongos possuem três parálogos, conhecidos como *Nlrp1a*, *Nlrp1b* e *Nlrp1c* (Ting et al., 2008). Estudos sugerem que as moléculas NLRP1, caspase-1, caspase-5 (ausente em camundongos) e ASC participam da montagem do inflamassoma de NLRP1 em humanos (Chu et al., 2001; Hlaing et al., 2001). Entretanto, a presença de ASC não é requerida para o processamento de caspase-1 por esse inflamassoma (Faustin et al., 2007). O inflamassoma de NLRP1B

é ativado em resposta ao *Bacillus anthracis* e especificamente à toxina letal em camundongos (Hsu et al., 2008). Embora muito progresso tenha sido realizado na elucidação do reconhecimento de *B. anthracis* pelo inflamassoma de NLRP1B, o mecanismo pelo qual a toxina letal desencadeia a ativação de NLRP1B permanece pouco compreendido. Além disso, em relação a *B. abortus*, até o presente momento não foi observado papel desse receptor durante a infecção por esse patógeno.

1.3.3 – O inflamassoma de NLRC4

Trabalhos demonstram que a montagem do inflamassoma de NLRC4 ocorre em resposta à flagelina bacteriana (Franchi et al., 2006; Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2006) e às subunidades proteicas Rod e agulha do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) (Miao et al., 2010; Zhao et al., 2011). Especula-se que quando há a injeção de proteínas efetoras no citosol celular por bactérias que possuem sistemas de secreção dos tipos 3 e 4, ocorre um “vazamento” de flagelina e de proteínas constituintes do sistema de secreção diretamente no citosol celular, as quais são reconhecidas pela molécula NAIP (do inglês “NLR family apoptosis inhibitory protein”) (Franchi et al., 2012). A molécula NAIP atua *upstream* de NLRC4 e cada um de seus tipos atua reconhecendo especificamente um desses PAMPs, sendo que NAIP2 reconhece a proteína rod, NAIP1 a proteína da agulha e NAIP5 e NAIP6 reconhecem a flagelina bacteriana (Broz and Dixit, 2016). Esse inflamassoma pode ser ativado por bactérias como *Legionella pneumophila* (Kanneganti et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Franchi et al., 2012; Franchi et al., 2007; Miao et al., 2008) e *Salmonella enterica* sorotipo typhimurium (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006).

Uma vez que NAIP reconhece a flagelina ou as proteínas constituintes do sistema de secreção, essa molécula se liga a NLRC4. Uma vez formada essa plataforma, ela

recruta caspase-1, e assim leva à morte celular por piroptose e à secreção de citocinas como IL-1 β e IL-18. Entretanto, essas respostas parecem ser mediadas por complexos distintos (Rathinam et al., 2012a). Acredita-se que haja um papel diferencial para a ação da caspase-1 nesses complexos distintos. Caspase-1 possui uma forma ativa, porém não clivada e uma forma ativa e clivada. A molécula adaptadora ASC possui um papel crucial nessa clivagem de caspase-1. Dessa forma, é possível distinguir dois complexos de inflamassoma: (1) um “inflamassoma de morte”, o qual requer ativação, mas não autoproteólise, de caspase-1 e é responsável pela morte celular por piroptose; (2) e um grande foco de ASC, o qual é formado quando ASC se agrega com as proteínas NLR e caspase-1, desencadeando a clivagem da caspase-1, que, dessa forma, leva ao processamento e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Broz et al., 2010; Rathinam et al., 2012a).

Em relação a *B. abortus*, Gomes e colaboradores (2013) observaram que macrófagos deficientes em NLRC4 são igualmente capazes de ativar caspase-1 e secretar IL-1 β em resposta a esse patógeno em comparação com macrófagos selvagens C57BL/6 (Gomes et al., 2013). Dessa forma, esse receptor se mostrou dispensável no seu reconhecimento.

1.3.4 – O inflamassoma de NLRP3

O receptor NLRP3, por sua vez, forma juntamente com a proteína adaptadora ASC um inflamassoma cuja ativação acontece por diversos estímulos diferentes (Franchi et al., 2012). Entre os possíveis estímulos estão sinais derivados do hospedeiro indicativos de dano ou estresse, como por exemplo, ATP extracelular, β -amiloides e cristais de urato (Mariathasan et al., 2006) (Halle et al., 2008) (Martinon et al., 2006). Além disso, os insultos ambientais como sílica, asbestos, alumínio ou radiação UVB também induzem

uma resposta inflamatória dependente da ativação de NLRP3 (Dostert et al., 2008) (Hornung et al., 2008) (Eisenbarth et al., 2008) (Feldmeyer et al., 2007). E por fim, microrganismos tais como *Influenza virus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e os produtos microbianos específicos tais como RNA bacteriano, cristais de hemozoína e toxinas bacterianas formadoras de poros como nigericina, aerolisina, listeriolisina, dentre outros, também ativam NLRP3 (Wilson et al., 2009) (Wu et al., 2010) (Kanneganti et al., 2006) (Dostert et al., 2009) (Gurcel et al., 2006).

Em 2013, nosso grupo de pesquisa demonstrou que macrófagos deficientes em NLRP3 ou ASC, apresentam uma menor secreção de IL-1 β e menor ativação de caspase-1 em comparação com macrófagos selvagens da linhagem C57BL/6. Além disso, quando os macrófagos selvagens da linhagem C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* deficiente no sistema de secreção do tipo IV *virB*, houve redução na secreção de IL-1 β em relação a macrófagos infectados com bactéria selvagem. Esses dados sugerem que *B. abortus* também é capaz de levar à ativação do inflamassoma de NLRP3/ASC levando à secreção de IL-1 β e ativação de caspase-1 de maneira dependente do sistema de secreção do tipo IV *virB* (Gomes et al., 2013).

Embora diferentes estímulos distintos tenham sido descritos como ativadores de NLRP3, por muito tempo permaneceu indeterminado o mecanismo pelo qual esse NLR é capaz de reconhecer esses estímulos. Vários diferentes mecanismos para a sua ativação foram propostos nos últimos anos, tais como liberação de DNA mitocondrial oxidado, produção de espécies reativas de oxigênio, desestabilização lisossomal, mudanças nos níveis de cálcio intracelular, formação de grandes poros não específicos na membrana e efluxo de potássio (Broz and Dixit, 2016). Recentemente, Munoz-Planillo e colaboradores (2013) propuseram a possibilidade de que a diminuição dos níveis de

potássio intracelular poderia ser o ponto de convergência entre todos esses estímulos e, portanto, responsável pela ativação do inflamassoma de NLRP3 (Munoz-Planillo et al., 2013). Entretanto, ainda não foi determinado se NLRP3 percebe diretamente esses níveis mais baixos de potássio ou se outro evento se correlaciona com essas menores concentrações de potássio.

1.3.5 – O inflamassoma não-canônico de caspase-11

Em 2011, Kayagaki e colaboradores (2011) relataram a existência de uma via de ativação de caspase-1 não canônica dependente de caspase-11 (Kayagaki et al., 2011). A caspase-11 murina é um membro da subfamília de proteases de caspase-1 e compartilha 46% de identidade com a caspase-1 murina (Wang et al., 1996). Em humanos, o ortólogo de caspase-11 murina pode ser tanto caspase-4 quanto caspase-5, entretanto, somente caspase-5 parece ser regulada de maneira semelhante à caspase-11 murina em resposta ao estímulo extracelular, tais como lipopolissacarídeos (LPS) e interferons (Lin et al., 2000; Viganò and Mortellaro, 2013). Na ativação não canônica do inflamassoma, a caspase-11 murina atua na ativação de caspase-1 de forma dependente de NLRP3 e ASC levando à secreção de IL-1 β e IL-18 (Kayagaki et al., 2011). Além disso, ela também é capaz de induzir processos de morte celular por piroptose e secreção de IL-1 α de forma independente de NLRP3/ASC (Kayagaki et al., 2011).

A ativação do inflamassoma de caspase-11 foi inicialmente relatada em macrófagos selvagens pré-tratados com LPS utilizando como estímulo as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Citrobacter rodentium*, além da toxina colérica B (CTB) (Kayagaki et al., 2011). Posteriormente, Rathinam e colaboradores (2012) demonstraram que essa ativação pode ser desencadeada por uma série de bactérias Gram-negativas capazes de ativar NLRP3 (Rathinam et al., 2012b). Até esse momento,

não havia sido identificado qual o PAMP presente nessas bactérias era o responsável por desencadear a ativação desse inflamassoma. Entretanto, em 2013, dois grupos de pesquisa transfectaram macrófagos murinos com LPS de bactérias Gram-negativas e observaram que a presença de LPS no interior da célula desencadeia a ativação da via não canônica, sugerindo a presença de um receptor intracelular de LPS de localização possivelmente citoplasmática, o qual leva à ativação de caspase-11, culminando em secreção de IL-1 β , IL-18 e piroptose (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2013). Isso explica porque bactérias Gram-negativas, mas não as Gram-positivas, são capazes de levar à ativação não canônica de NLRP3. Além disso, os dados demonstraram que esse receptor intracelular reconhece o lipídeo A hexa-acilado ou penta-acilado do LPS, mas não o tetra-acilado, sugerindo uma importante estratégia bacteriana de subversão de mecanismos de vigilância citoplasmática através de modificações no lipídeo A. Essas modificações dificultariam seu reconhecimento por esse receptor intracelular (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2013). Experimentos subsequentes de outro grupo de pesquisa confirmaram esses achados e sugerem que o receptor intracelular de LPS seria a própria molécula de caspase-11, a qual reconheceria o LPS através de seu domínio CARD (Shi et al., 2014). Por sua vez, esse reconhecimento leva a autoproteólise da caspase-11, a qual é necessária para sua atividade catalítica ideal, desencadeando respostas como a piroptose e liberação de IL-1 β (Lee et al., 2018).

O envolvimento do inflamassoma não-canônico no controle de infecções bacterianas já foi relatado para diferentes espécies. Por exemplo, *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria Gram-negativa, induz o processo de piroptose dependente de caspase-11 em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs), levando à secreção de IL-1 α e IL-1 β . De fato, camundongos deficientes em caspase-11 apresentaram comprometimento no recrutamento de neutrófilos e no “clearance” bacteriano durante a infecção por *K.*

pneumoniae, acompanhados por uma redução na liberação de IL-1 α , uma citocina crítica para o recrutamento de neutrófilos neste modelo. Esses resultados sugerem que a piroptose leva à liberação de IL-1 α , a qual leva ao recrutamento de neutrófilos, culminando em controle da infecção por *K. pneumoniae* (Wang et al., 2017a). Além disso, a bactéria patogênica *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium coloniza o epitélio intestinal de camundongos deficientes em caspase-11 de forma mais eficiente do que o de animais selvagens. A carga de patógenos aumentada foi correlacionada com a ausência de morte celular piroptótica, um mecanismo de defesa do hospedeiro que auxilia na extrusão de células infectadas na tentativa de restaurar a homeostase intestinal (Knodler et al., 2014). Além disso, um papel para caspase-11 atuando no controle da infecção bacteriana foi determinado para *Acinetobacter baumannii*, uma bactéria patogênica que pode causar infecção pulmonar grave. Nesse caso, a deficiência de caspase-11 aumentou a carga bacteriana nos pulmões, baço e fígado (Wang et al., 2017b). De maneira similar, a caspase-11 levou ao controle da infecção por *B. melitensis* nas articulações e exacerbou a resposta inflamatória contra esse patógeno nas articulações (Lacey et al., 2018). Além disso, bactérias Gram-negativas, como *Burkholderia pseudomallei* e *B. thailandensis* que naturalmente invadem o citosol são alvo de caspase-11. De fato, caspase-11 protegeu os camundongos do desafio letal com espécies de *Burkholderia* (Aachoui et al., 2013).

A ativação da caspase-11 não se restringe ao reconhecimento do LPS. Dados recentes demonstraram que a caspase-11 é crucial para o controle da infecção por *Leishmania* (de Carvalho et al., 2019). A ativação do inflamassoma não-canônico foi atribuída à molécula de membrana denominada lipofosfoglicana, formada por uma parte lipídica ligada a uma porção polissacarídica, que envolve as espécies de *Leishmania*. Além disso, parasitas que não possuem lipofosfoglicana são incapazes de desencadear a ativação da caspase-11. Curiosamente, os ensaios de ligação livre de células falharam em

mostrar a interação direta da lipofosfoglicana com caspase-11, implicando que moléculas citoplasmáticas adicionais podem participar desse processo (de Carvalho et al., 2019). Por outro lado, sob estresse oxidativo que pode ser gerado durante infecções microbianas, fosfolipídios oxidados endógenos que são formados na célula, tais como 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosforilcolina (oxPAPC) (Freigang, 2016) podem ligar-se ao domínio catalítico de caspase-11 inibindo sua atividade enzimática (Zanoni et al., 2016). Além disso, a interação oxPAPC-caspase-11 medeia a secreção de IL-1 β , mas não promove a piroptose nas células dendríticas (Zanoni et al., 2016). Assim, a atividade proteolítica da caspase-11 é necessária para induzir a morte celular, mas não a liberação de IL-1 β da célula dendrítica. Um modelo no qual oxPAPC pode induzir a formação de um hetero-complexo de caspase-1/11 levando ao processamento e secreção de IL-1 β foi proposto (Zanoni et al., 2016). Além disso, oxPAPC parece atuar como um regulador de caspase-11 em macrófagos, mas não em células dendríticas. A caspase-11 se liga ao oxPAPC competindo com o LPS citoplasmático, impedindo assim a indução de piroptose e a liberação de IL-1 β em resposta ao LPS (Chu et al., 2018). Dessa forma, oxPAPC pode modular o inflamassoma não-canônico oferecendo uma nova abordagem terapêutica contra o choque séptico induzido por bactérias Gram-negativas.

1.3.5.1 – As proteínas ligadoras de guanilato – GBPs

Várias bactérias Gram-negativas não citosólicas desencadeiam a ativação da caspase-11 (Kayagaki et al., 2011; Kayagaki et al., 2013; Meunier et al., 2014; Rathinam et al., 2012b), levantando a questão de como o LPS dessas bactérias obtém acesso ao citosol.

Curiosamente, durante a infecção, a ativação da caspase-11 requer a produção de IFN do tipo I, bem como a indução de genes estimulados por IFN (Broz et al., 2012;

Rathinam et al., 2012b). Entre os genes mais fortemente estimulados por IFN, os GBPs, uma classe de GTPases abrangendo 65 a 73 kDa, são proeminentes (Kim et al., 2016; Kim et al., 2011; Meunier et al., 2014). Os GBPs são extremamente conservados entre os vertebrados e 7 genes que codificam os GBP humanos (GBP1-GBP7) foram identificados dentro de um único cluster no cromossomo 1 (Man et al., 2017). Já no caso dos camundongos, os genes que codificam os GBPs se localizam em dois cromossomos distintos. Os genes que codificam mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP5 e mGBP7 estão agrupados no cromossomo 3 (GBP^{chr3}), enquanto os que codificam mGBP4, mGBP6, mGBP8, mGBP9, mGBP10 e mGBP11 estão localizados no cromossomo 5 (Degrandi et al., 2007; Kim et al., 2011; Olszewski et al., 2006; Shenoy et al., 2007). Os GBPs são encontrados principalmente no citoplasma, associados com membranas intracelulares, dentro de estruturas semelhantes a vesículas ou no núcleo, (Kravets et al., 2016; Shenoy et al., 2007; Tripal et al., 2007; Vestal et al., 2000) e exibem efeitos antimicrobianos contra bactérias intracelulares, vírus e protozoários (Kim et al., 2011; Ngo and Man, 2017; Yamamoto et al., 2012).

Os efeitos dependentes de GBP na ativação do inflamassoma não-canônico têm sido demonstrados para vários patógenos bacterianos vacuolares e citosólicos, incluindo *S. typhimurium*, *L. pneumophila*, *V. cholerae*, *Shigella flexneri*, *C. rodentium*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* e *Pseudomonas aeruginosa* deficiente no sistema de secreção tipo 3 (T3SS) (Balakrishnan et al., 2018; Broz et al., 2012; Finethy et al., 2015; Meunier et al., 2014; Pilla et al., 2014). Por exemplo, macrófagos murinos deficientes nos GBP^{chr3} apresentaram níveis reduzidos de ativação do inflamassoma não-canônico e piroptose durante a infecção por *S. typhimurium* e *L. pneumophila* (Meunier et al., 2014; Pilla et al., 2014; Thurston et al., 2016).

Mecanicamente, os GBPs podem induzir a montagem do inflamassoma direta ou indiretamente. Diretamente, os GBPs podem interagir fisicamente com o maquinário do inflamassoma, facilitando sua montagem tanto nas vias canônicas quanto não-canônicas (Kim et al., 2016; Shenoy et al., 2012). Indiretamente, os GBPs podem promover a lise de vacúolos contendo patógenos (PCVs – do inglês “Pathogen-containing vacuoles”), destruindo assim o nicho microbiano e expondo o LPS bacteriano para detecção *downstream* por caspase-11 no citosol. De fato, um experimento demonstrou que a ativação de caspase-11 e a morte celular induzida por *S. typhimurium* exigem a expressão das proteínas GBP^{chr3} confirmando o papel dos GBPs na ativação do inflamassoma não-canônico (Meunier et al., 2014). Os mecanismos pelos quais os GBPs detectam e se ligam aos PCVs permanecem pouco caracterizados; no entanto, em células murinas infectadas com *Yersinia* ou *Legionella*, o recrutamento de GBP para os PCVs parece estar ligado ao sensor de dano vacuolar galectina-3. Neste caso, a inserção de sistemas de secreção bacterianos em PCVs desestabiliza a estrutura de sua membrana, expondo o seu lado luminal a proteínas citosólicas do hospedeiro. De fato, a exposição citosólica de glicanos intravacuolares do hospedeiro derivada do dano vacuolar leva ao recrutamento de galectina-3, que leva mGBP2 para os PCVs em uma resposta imune coordenada (Feeley et al., 2017).

Macrófagos murinos infectados com *B. abortus* apresentam agregados de mGBP2 localizados próximos aos PCVs. Além disso, um número reduzido de PCVs rompidos foi observado em células deficientes em GBP^{chr3} quando comparadas com células do tipo selvagem (Costa Franco et al., 2018), sugerindo que os GBPs orquestram a vigilância do hospedeiro durante a infecção por *B. abortus*. Esses resultados sugerem que os GBPs são centrais para atingir e romper o PCV de *B. abortus* (Costa Franco et al., 2018).

Além disso, a indução de piroptose dependente de caspase-11 pelo LPS citoplasmático derivado de *L. pneumophila* também requer proteínas GBP^{chr3}. Da mesma forma, a piroptose em macrófagos infectados por um mutante de *L. pneumophila* que invade o citosol também foi dependente de proteínas GBP^{chr3}, sugerindo um papel para as GBPs na detecção de LPS citoplasmático e/ou na ativação subsequente do inflamassoma não-canônico (Pilla et al., 2014). O LPS citoplasmático derivado de *E coli* e *Salmonella* desencadearam a piroptose mesmo na ausência de proteínas GBP^{chr3}, embora com uma ligeira redução na eficiência. Estas observações podem potencialmente ser explicadas por diferenças estruturais na porção lipídica A das variantes do LPS derivadas dessas espécies bacterianas distintas (Pilla et al., 2014).

Além disso, um estudo a seguir sugeriu que os GBPs não estavam apenas envolvidos no dano vacuolar, mas também na lise bacteriana direta (bacteriólise) (Man et al., 2015). De fato, evidências emergentes mostraram que mGBP2 e mGBP5 citoplasmáticos interagem com a membrana de *F. novicida* após sua liberação dos PCVs e promovem a lise citosólica desse patógeno (Meunier et al., 2015). Dessa forma, os GBPs recrutam o membro da família das GTPases relacionado à imunidade b10 (IRGB10), que tem como alvo direto as bactérias intracelulares promovendo a bacteriólise. Assim, o IRGB10 contribui para a liberação de PAMPs citosólicos bacterianos para reconhecimento por sensores dos inflamassomas: a detecção do LPS por caspase-11 e a detecção do DNA pelo inflamassoma de AIM2 (Man et al., 2016). Curiosamente, a bacteriólise de *F. novicida* citosólica mediada por GBPs leva à liberação de DNA genômico bacteriano no citosol, o qual ativa tanto inflamassomas canônicos e quanto não-canônicos (Meunier et al., 2015; Wallet et al., 2017). Não está claro se a ativação dependente de caspase-11 observada ocorre devido à detecção do LPS de *F. novicida* ou outro ligante, uma vez que a caspase-11 não reconhece o LPS pouco acilado de

Francisella (Hagar et al., 2013). Notavelmente, *P. aeruginosa* deficiente no T3SS prolifera no citoplasma evitando a detecção por NLRP3 e NLRC4, mas é reconhecida por mGBP2 e IRGB10. Curiosamente, apenas o mGBP2 promove a morte bacteriana, enquanto que tanto o mGBP2 e o IRGB10 permitem a ativação de caspase-11 levando à morte da célula hospedeira. Assim, durante a infecção por *P. aeruginosa* deficiente no T3SS, a morte bacteriana e a exposição de ligantes bacterianos são dois processos não ligados (Balakrishnan et al., 2018). Coletivamente, os GBPs são cruciais não apenas durante as infecções por patógenos vacuolares, mas também na apresentação de ligantes ocultos por terem diretamente como alvo as bactérias citosólicas. Além dessa função lítica exibida pelos GBPs murinos sobre patógenos específicos, os GBPs humanos marcam e restringem a disseminação bacteriana por um mecanismo diferente. O GBP1 humano reconhece o O-antígeno presente no LPS de *S. flexneri* e promove o co-recrutamento de 4 parálogos adicionais de GBP (GBP2, GBP3, GBP4 e GBP6). O GBP1 exibe um motivo proteico polibásico específico que contém uma tripla-arginina essencial para o reconhecimento de *S. flexneri*. A bactéria *S. flexneri* decorada com GBP1 não tem a capacidade de formar caudas de actina e, portanto, não possui motilidade, o que evita sua disseminação célula a célula (Piro et al., 2017; Wandel et al., 2017). De forma interessante, a ubiquitina ligase IpaH9.8 secretada pelo sistema de secreção tipo 3 de *Shigella* interfere com o GBP1 direcionado para bactérias citosólicas. De fato, IpaH9.8 ubiquitina os GBPs humanos para a degradação proteasomal e, portanto, restaura a motilidade mediada por actina, promovendo a disseminação bacteriana (Piro et al., 2017; Wandel et al., 2017).

Mecanismos adicionais de atividade antimicrobiana também estão relacionados aos GBPs. As bactérias Gram-negativas produzem e liberam vesículas da membrana externa (OMVs) durante a infecção, as quais são internalizadas pelos macrófagos e

funcionam como um veículo que carrega e entrega o LPS (e vários outros antígenos de superfície) no citosol do hospedeiro. Os LPS carregados e entregues por OMVs podem desencadear a ativação de caspase-11 promovendo a ativação do inflamassoma não-canônico, desempenhando um papel central na defesa do hospedeiro e na patogênese bacteriana (Kaparakis-Liaskos and Ferrero, 2015; Vanaja et al., 2016). Além disso, as OMVs das bactérias Gram-negativas *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Shigella* ativam o inflamassoma não-canônico de maneira dependente de GBP^{chr3}. Nesse contexto, os GBPs podem romper as OMVs e, portanto, liberar o LPS para que ele, assim, possa desencadear a ativação de caspase-11 (Santos et al., 2018). De fato, devido à natureza hidrofóbica da porção lipídeo A do LPS, os GBPs podem facilitar a ligação de caspase-11 ao próprio LPS intracelular e também ao LPS de membranas lipossômicas transfetadas experimentalmente (Santos et al., 2018).

1.3.5.2 – A piroptose dependente da gasdermina

Desde a última década é sabido que os inflamassomas respondem ao reconhecimento de PAMPs e DAMPs com a formação de poros na membrana em um processo de morte celular inflamatória dependente de caspase-1 conhecida como piroptose (Cookson and Brennan, 2001; Martinon et al., 2009). Com a descoberta da via não canônica de caspase-11, foi reportado que esta molécula é capaz de desencadear morte celular por piroptose em resposta a LPS de maneira independente de NLRP3/ASC/caspase-1 (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2011; Kayagaki et al., 2013). No entanto, o mecanismo exato envolvido na piroptose permaneceu incerto por longos anos até que recentemente, dois grupos de pesquisa identificaram, utilizando metodologias distintas, uma nova molécula que atua como substrato de caspase-1 e caspase-11 no processo de piroptose (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015). Essa

proteína é a gasdermina D, a qual atua como substrato tanto de caspase-11 quanto caspase-1 (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015). GSDMD pertence a uma família de proteínas identificadas pela primeira vez no trato gastrointestinal e na derme, por isso, foi chamada de "gasdermin" (Saeki et al., 2000; Tamura et al., 2007). Estas moléculas são expressas em uma variedade de tipos celulares e tecidos e englobam um grupo de seis proteínas em humanos e dez proteínas em camundongos (Feng et al., 2018). Todas as proteínas GSDMs, exceto Pejvakin (PJKV), podem ser potencialmente clivadas por caspases, desencadeando oligomerização e formação de poros na membrana. Este mecanismo é bem conhecido para GSDMD e GSDME (DFNA5). A GSDME é clivada pela caspase-3 apoptótica liberando o domínio N-terminal que se insere na membrana plasmática, levando a um processo de necrose secundária (Rogers et al., 2017). A GSDMD é clivada pela caspase-1 e caspase-11 gerando um domínio C-terminal (p20) e um N-terminal ativo (p30) (Kayagaki et al., 2015; Rogers et al., 2017; Shi et al., 2015). Além disso, a inibição da atividade da cinase-1 ativada pelo fator de crescimento transformador β (TAK1) provoca a clivagem de GSDMD por caspase-8 similarmente à clivagem por caspase-1 e caspase-11 (Orning et al., 2018; Sarhan et al.).

Uma vez que a clivagem de GSDMD ocorre, o domínio N-terminal é inserido na membrana plasmática e oligomeriza-se formando poros de 10-16 nm de diâmetro (Broz, 2015; Ruan et al., 2018). O efluxo de potássio pode ocorrer através desses poros, desencadeando a ativação do inflamassoma de NLRP3/ASC (Baker et al.; Munoz-Planillo et al., 2013; Perregaux and Gabel, 1994; Petrilli et al., 2007; Ruhl and Broz, 2015; Schmid-Burgk et al., 2015). Além disso, substratos de menor diâmetro como IL-1 β maduro (Evavold et al., 2018; He et al., 2015), IL-18 e mediadores inflamatórios como eicosanóides podem ser liberados através dos poros, levando ao recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (Jorgensen et al., 2016a). Além disso, quando a água

entra nas células, causa um desequilíbrio osmótico que pode culminar com a ruptura e morte celular (Gaidt and Hornung, 2016). No entanto, novos dados demonstraram que as células podem reparar os poros da membrana para regular a piroptose e liberação de citocinas (Evavold et al., 2018; Ruhl et al., 2018). Este processo é coordenado pelo maquinário do complexo de endereçamento endossomal necessário para o transporte (ESCRT), o qual remove os poros liberando vesículas, conhecidas como ectossomos, da membrana plasmática para o espaço extracelular (Andrews et al., 2014; Jimenez et al., 2014; Scheffer et al., 2014). O ESCRT atua “downstream” a GSDMD de maneira dependente do influxo de Ca^{2+} através dos poros na membrana dependentes de GSDMD, o que desencadeia o recrutamento de proteínas ESCRT para sítios de membrana danificados (Ruhl et al., 2018).

Tanto inflamassomas canônicos quanto não-canônicos podem desencadear a piroptose dependente de GSDMD, visto que a clivagem de GSDMD pode ser executada tanto por caspase-1 quanto por caspase-11. Bactérias Gram-negativas como *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. flexneri* e *B. thailandensis* ativam caspase-11 promovendo a clivagem de GSDMD e a formação de poros (Kayagaki et al., 2015). Por outro lado, inflamassomas canônicos como AIM2 e NLRC4 desencadeiam morte celular piroptótica de maneira também dependente de GSDMD. Por exemplo, o inflamassoma de AIM2 é requerido para a clivagem de GSDMD em resposta a *F. novicida*. De fato, camundongos *Gsdmd*^{-/-} são mais suscetíveis à infecção por *F. novicida*, sugerindo a necessidade de GSDMD para a restrição da infecção deste patógeno (Zhu et al., 2018). Com relação à ativação do inflamassoma de NLRC4, a flagelina não induziu a formação de poros em BMDMs de camundongos *Gsdmd*^{-/-} nos momentos iniciais, embora a piroptose tenha acontecido em momentos posteriores. Portanto, este resultado sugere que a caspase-1 pode clivar outros substratos pró-piroptóticos além de GSDMD (Kayagaki et al., 2015).

Vários mecanismos pelos quais a piroptose dependente de GSDMD pode contribuir para a restrição de infecção bacteriana foram propostos. Um deles sugere que quando a célula morre por piroptose, as bactérias intracelulares permanecem aprisionadas nessas células formando estruturas denominadas armadilhas intracelulares induzidas por poros (PITs – do inglês “Pore-induced intracellular traps”) (Jorgensen et al., 2016b). Além disso, a secreção de citocinas e mediadores através dos poros de GSDMD leva a um recrutamento de neutrófilos, os quais removem esses PITs pelo processo de eferocitose, auxiliando no controle da infecção bacteriana (Jorgensen et al., 2016a; Jorgensen et al., 2016b). Ademais, estudos recentes associaram a molécula de GSDMD à liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs – do inglês “Neutrophil extracellular traps”), um processo de morte celular chamado de NETose (Chen et al., 2018; Sollberger et al., 2018). Essas estruturas são compostas de DNA neutrofílico e proteínas granulares, tais como elastase neutrofílica (NE), mieloperoxidase (MPO) e catepsina G. Essas NETs atuam como uma barreira que evita a disseminação bacteriana e também matam os patógenos pela degradação de seus fatores de virulência (Brinkmann et al., 2004) . Em vista disso, a GSDMD pode ser clivada por serino-proteases como NE (Sollberger et al., 2018). Uma vez clivada, ela leva à formação de poros na membrana dos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, contribuindo para o aumento da liberação de NE no citoplasma (Sollberger et al., 2018). A NE liberada no citoplasma pode entrar no núcleo onde processa as histonas para promover a descondensação da cromatina, desencadeando a expansão nuclear, que é uma etapa importante durante o processo de NETose (Papayannopoulos et al., 2010). Além disso, o NE liberado no citosol também pode clivar mais GSDMD, promovendo um feedback positivo, uma vez que GSDMD desencadeia uma maior formação de poros nas membranas dos grânulos azurofílicos dos neutrófilos. Finalmente, a GSDMD clivada também se insere na membrana plasmática

celular culminando em lise celular e liberação de NETs (Sollberger et al., 2018). Notavelmente, este é um processo no qual a GSDMD está envolvida na formação de poros, independente da ativação do inflamassoma. Por outro lado, os PAMPs que desencadeiam a ativação do inflamassoma não-canônico, como o LPS intracelular, podem desencadear a formação de NETs dependente de GSDMD, mas independente das proteínas clássicas, tais como NE e MPO, descrevendo uma nova via de liberação de NETs (Chen et al., 2018). Além disso, fragmentos N-terminais de GSDMD foram encontrados nestas armadilhas após sua liberação pela célula, sugerindo um possível papel para GSDMD na restrição de patógenos por matar diretamente os micróbios fora das células (Sollberger et al., 2018). Notavelmente, essa morte direta pode constituir uma nova maneira pela qual o GSDMD reduz a disseminação de patógenos viáveis a partir de células piroptóticas, embora ainda não esteja confirmada por estudos *in vivo*. Além disso, GSDMD atacando as membranas bacterianas pode resultar na liberação de PAMPs no citosol. Este mecanismo foi recentemente hipotetizado para explicar a resposta de *F. novicida* durante a ativação do inflamassoma de AIM2 (Zhu et al., 2018). Em resposta a *F. novicida*, a GSDMD é necessária para a ativação ótima de caspase-1. Como BMDMs *Gsdmd*^{-/-} exibem ativação residual da caspase-1, sugeriu-se que, durante a fase inicial da infecção por *F. novicida*, ela ativa a caspase-1 independente da GSDMD. No entanto, uma vez ativa, a caspase-1 cliva GSDMD, que pode formar poros na bactéria intracelular causando sua lise e liberação de DNA que, em uma retroalimentação positiva, ativa o AIM2 levando a mais ativação de caspase-1 e piroptose (Zhu et al., 2018). Em vista disso, o fragmento N-terminal de GSDMD pode interagir com membranas bacterianas ricas em cardiolipina formando poros e causando bacteriolise, como mostrado quando o fragmento N-terminal foi incubado *in vitro* com *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (Liu et al., 2016).

Em resumo, os dados recentes da literatura sugerem uma intrincada rede de vias de sinalização durante a ativação do inflamassoma não-canônico, e conseqüentemente, da piroptose dependente de GSDMD (Fig. 4). A caspase-11, com a participação dos GBPs, é ativada pelo LPS citosólico derivado de PCVs ou OMVs, iniciando a via não-canônica do inflamassoma. Posteriormente, a clivagem da GSDMD pela caspase-11 ativa produz um fragmento N-terminal que induz a formação de poros nas membranas celulares. Este processo, em última análise, leva à piroptose, um programa de morte celular importante para a eliminação de bactérias intracelulares. Além disso, o efluxo de K^+ pode induzir a montagem do inflamassoma de NLRP3, o que resulta na ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β . Vale ressaltar que as bactérias podem interagir com vários PRRs durante sua infecção, e a ativação ou inibição de uma via de transdução de sinal pode afetar outras vias. Por exemplo, o efluxo de K^+ pode ser um resultado de diferentes estímulos, além da formação de poros dependentes de GSDMD. Além disso, inflamassomas canônicos, como AIM2 ou NLRC4, desencadeiam a piroptose de maneira dependente de GSDMD, sugerindo que regularmente ocorre um “crosstalk” dessa via complexa de sinalização. Nesse contexto, os GBPs que atacam os PCVs podem liberar diferentes fatores além do LPS, como o DNA, possibilitando a ativação de múltiplas vias concomitantemente. Além disso, a secreção de mediadores durante a piroptose pode recrutar células, como os neutrófilos, que são participantes proeminentes do “clearance” bacteriano. Assim, a ativação não-canônica do inflamassoma é conhecida como um processo de coordenação projetado para restaurar a integridade e a função do tecido.

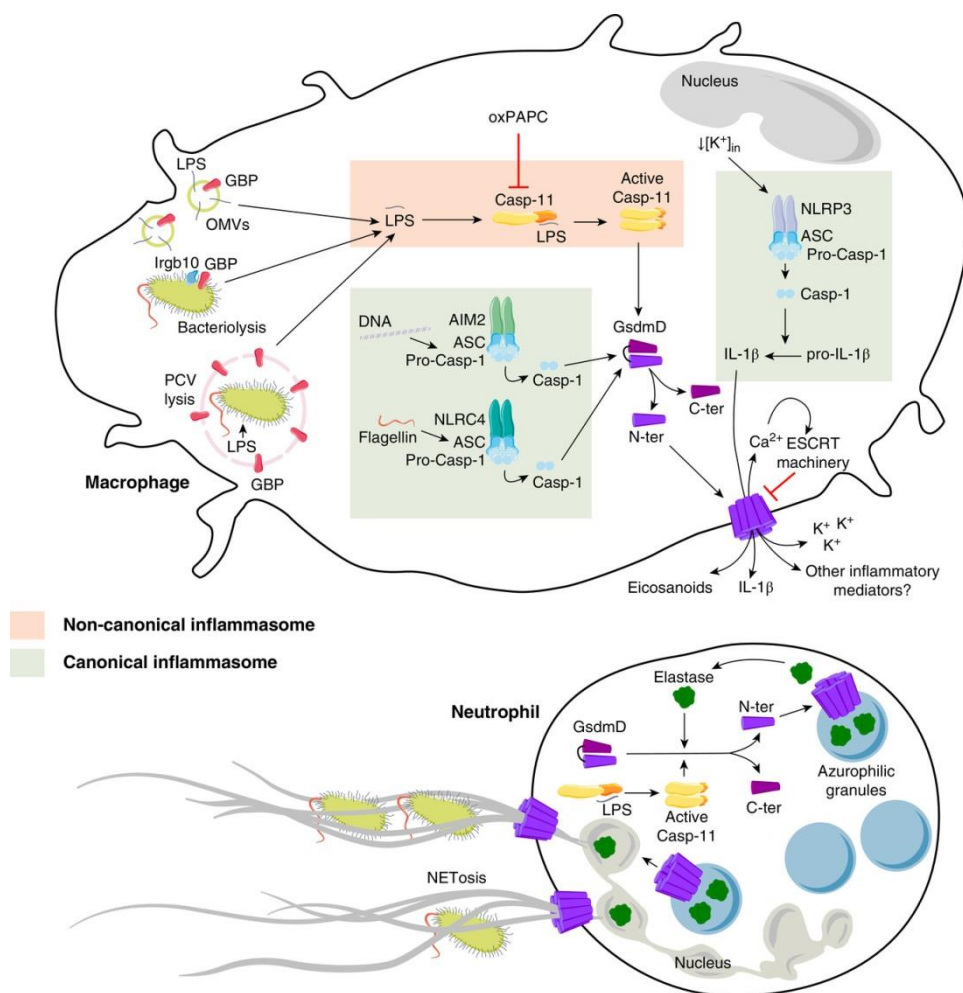


Figura 4: Bases moleculares da ativação do inflamassoma não-canônico levando à piroptose e restrição de infecções bacterianas. (Gomes et al., 2019)

1.4 – A resposta imune inata frente à infecção por *B. abortus*

A resposta imune inata contra *B. abortus* começa após a interação com as APCs através do reconhecimento dessa bactéria por receptores de reconhecimento de padrões, tais como TLRs e NLRs (Marim et al., 2017b). MyD88 e IRAK4 são moléculas críticas envolvidas na via de sinalização de TLRs que resulta na ativação de vias de NF-κB, MAPKs e produção de citocinas inflamatórias. Estas moléculas desempenham um papel essencial na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e no controle da infecção de *B. abortus* em camundongos (Macedo et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Weiss

et al., 2005). Embora o LPS modificado de *B. abortus* seja um fraco ativador de TLR4, a proteína de membrana externa (OMP) 16 (U-OMP16) derivada de *B. abortus* é capaz de desencadear a produção de citocinas inflamatórias dependentes de TLR4 (Pasquevich et al., 2010; Weiss et al., 2005). Além disso, o L-Omp19 desencadeia a produção de TNF- α e IL-6 dependente de TLR2 em macrófagos peritoneais de camundongos (Delpino et al., 2012). Embora o TLR2 e o TLR4 não desempenhem nenhum papel no controle da infecção por *B. abortus* em camundongos, o TLR9 se correlaciona com a restrição de infecção e, recentemente, o TLR9 mostrou ser ativado por motivos CpG derivados do DNA de *B. abortus* (Gomes et al., 2016; Weiss et al., 2005). Estudos publicados anteriormente do nosso grupo revelaram que *B. abortus* também pode ser reconhecida pelas proteínas NLRs. NOD1 e NOD2 contribuem para a sinalização de NLRs em resposta a *B. abortus*, uma vez que BMDMs deficientes em NOD1 e NOD2 produziram níveis reduzidos de TNF- α (Oliveira et al., 2012). No entanto, a ausência dessas moléculas não foi crítica para o controle da infecção de *B. abortus* (Oliveira et al., 2012). Além disso, *B. abortus* pode desencadear ativação de inflamassomas dependentes de ASC, como NLRP3 e AIM2, levando à ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β (Campos et al., 2014; Gomes et al., 2013; Marim et al., 2017b). Entretanto, a importância da via não-canônica e, portanto de caspase-11 e GSDMD em resposta a *B. abortus* permanecem desconhecida. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi a avaliação do papel do inflamassoma não-canônico em resposta à infecção por *B. abortus* envolvendo sua importância no controle da infecção dessa bactéria.

2- Justificativa

Nos últimos anos, um grande progresso foi realizado no controle da brucelose em diversos países, porém há ainda várias regiões nas quais a infecção em animais domésticos persiste, levando à frequente transmissão para a população humana. Em várias partes do mundo, especialmente nos países mediterrâneos da Europa, no norte e leste da África, no Oriente Médio, na Ásia sul e central, e nas Américas Central e Sul, a brucelose ainda é uma doença humana importante e muito frequentemente não reconhecida, e assim não reportada. Poucos países no mundo estão oficialmente livres da doença e casos envolvendo pessoas retornando de países endêmicos ainda ocorrem (WHO, 2006). Além disso, no Brasil a brucelose bovina ainda é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária (Santos et al., 2013). Dessa forma, o estudo dos mecanismos envolvidos no controle da infecção de *B. abortus* é fundamental para controle da doença no Brasil e no mundo.

Recentemente, foi observado que diversas espécies de bactérias Gram-negativas são capazes de desencadear a ativação de um inflamassoma não-canônico dependente de caspase-11 (Rathinam et al., 2012b). Nesse processo, caspase-11 reconhece o LPS bacteriano no citoplasma levando à piroptose e secreção de IL-1 α , além de desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3/ASC levando à secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2011; Kayagaki et al., 2013; Shi et al., 2014). Gomes e colaboradores (2013) observaram que *B. abortus* é capaz de levar à ativação do inflamassoma de NLRP3/ASC levando à ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β (Gomes et al., 2013). Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar a participação de caspase-11 na resposta à infecção por *B. abortus*, incluindo a ativação do inflamassoma de NLRP3 e o controle da infecção, a fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos na resposta a esse patógeno. A partir do avanço na compreensão dos

mecanismos envolvidos na ativação molecular de caspase-11 e do inflamassoma, esperamos prover informações relevantes para a elucidação de novos componentes do sistema imune que atuam no reconhecimento da bactéria *B. abortus* e de seus derivados. Em um contexto mais amplo, esperamos complementar o modelo do mecanismo de ativação celular induzido por este procarioto *in vitro* e vislumbrar a relevância desses componentes da imunidade inata no controle da infecção *in vivo*.

3- Objetivos

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar o papel do inflamassoma não-canônico em resposta à infecção por *B. abortus*.

3.2 – Objetivos Específicos

- i. Determinar o papel de caspase-11 na secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e na ativação de caspase-1 em BMDM (do Inglês “Bone Marrow-Derived Macrophages”) em resposta a *B. abortus*.
- ii. Investigar o papel de caspase-11 na morte celular por piroptose em BMDM em resposta a *B. abortus*.
- iii. Investigar o papel das GBPs na indução da via não canônica em resposta a *B. abortus*.
- iv. Avaliar o papel de GSDMD na piroptose induzida por *B. abortus* e na ativação do inflamassoma de NLRP3/ASC em resposta a essa bactéria.
- v. Avaliar o papel de caspase-11 e GSDMD na restrição da infecção por *B. abortus* em BMDM *in vitro* e em modelo murino de infecção *in vivo* e os mecanismos envolvidos nesse processo.

4- Material e métodos

4.1 – Bactérias

A cepa 2308 de *B. abortus* foi obtida da nossa coleção do laboratório. Já a cepa mutante de *B. abortus* $\Delta virB2$ utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelo Dr. Renato de Lima Santos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil (Mol et al., 2014). Essa cepa mutante foi obtida por troca alélica do gene *virB2*, gerando uma deleção polar de *virB2*. Todas as bactérias foram cultivadas em meio de cultura Brucella broth (BD Pharmingen, San Diego, CA) durante 1 dia a 37°C sob agitação constante. A densidade óptica da cultura a 600 nm foi medida em um espectrofotômetro para determinar o número de bactérias na solução.

4.2 – Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (selvagem) adquiridos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos *Nlrp3^{-/-}* e *Casp1/11^{-/-}* foram descritos previamente e retrocruzados com camundongos C57BL/6 por pelo menos oito gerações (Kuida et al., 1995; Mariathasan et al., 2006). Camundongos *Casp11^{-/-}*, *Gsdmd^{-/-}*, *Gbp2^{-/-}* e *Gbp^{chr3-/-}* foram gerados a partir do fundo genético C57BL/6 (Degrandi et al., 2013; Kayagaki et al., 2015; Kayagaki et al., 2011; Yamamoto et al., 2012). Os camundongos *Casp1^{-/-}Casp-11^{Tg}* foram gerados a partir de camundongos *Casp1/11^{-/-}* que receberam um transgene que codifica uma cópia funcional do alelo da caspase-11, como descrito anteriormente (Kayagaki et al., 2011). Os animais foram mantidos na UFMG e utilizados com 6-9 semanas de idade.

4.3 – Declaração de ética

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as leis brasileiras 6638 e 9605 em Experimentação Animal. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Número da Licença: CETEA # 128/2014).

4.4 – Genotipagem de camundongos *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}*

As biópsias das orelhas dos camundongos foram obtidas e inseridas em tubos de 0,2 ml estéreis. Para a extração do DNA, foi acrescentado 75 µl por amostra de solução de lise alcalina (25 µM de NaOH, 0,2 µM de Na₂EDTA, pH 12) e incubado por 1 h a 95° no termociclador. A solução de neutralização (40 µM de Tris HCl, pH 5) foi adicionada no volume de 75 µl por amostra. Extraído o DNA, este foi submetido à técnica de PCR. Para o PCR foi utilizado um par de iniciadores capaz de amplificar caspase-11 presente no plasmídeo BAC (Fw: CTGCATTGCCTAGCTGCATT; Rv: GGGTACCTGAGGATGAAGGA) e um par de iniciadores a ser usado como controle da presença de DNA nas amostras, o qual é capaz de amplificar o gene constitutivo de camundongos TCRD (Fw: GTCAGTCGAGTGCACAGTTT; Rv: CAAATGTTGCTTGCTGCTGGTG). Como controle positivo e negativo da reação de PCR, foram utilizados DNA de um animal sabidamente *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}* e DNA de um animal sabidamente *Casp1/11^{-/-}*, respectivamente. Além disso, como controle geral de contaminação da reação, foi realizado PCR de uma amostra na ausência de DNA.

4.5 – Preparo de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

Os BMDMs foram diferenciados *in vitro* a partir de células-tronco extraídas do fêmur de camundongos. As culturas foram diferenciadas por 7 dias em estufa a 37°C, 5%

CO₂ em meio DMEM suplementado com 1% de HEPES, 20% de soro fetal bovino (SFB), 30% de meio condicionado por células L929 (LCCM) fonte de M-CSF (importante para diferenciação de células progenitoras em macrófagos), 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de streptomicina. Após a diferenciação, os macrófagos foram coletados pela lavagem das monocamadas com PBS gelado, distribuídos em placas de cultura e cultivados em meio DMEM, contendo 1% SFB e 1% HEPES ou 10% SFB e 1% HEPES, dependendo do experimento.

4.6 – Transfecção de LPS de *B. abortus* em BMDMs

BMDM foram dispostas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço). Para o ensaio, as células foram pré-tratadas com PAM3CSK (1 µg/ml) por 6 h. Para a transfecção, foram feitas duas soluções ambas com volume final de 50µl: uma contendo meio DMEM sem soro fetal bovino e com FuGENE[®]HD (Promega, Madison, USA) na concentração final de 0,25% para o volume final de cada poço (2,5 µl/ml); e outra contendo meio DMEM sem soro e com LPS de *B. abortus* na concentração 5 µg/ml. As duas soluções foram misturadas e mantidas por 15 min a temperatura ambiente antes da adição às células. Após esse tempo, a solução contendo FuGENE[®]HD mais LPS foi adicionada às BMDMs já submetidas a meio DMEM sem SFB suplementado com 1% de HEPES. Após 17 h da transfecção, o sobrenadante e o lisado das células foi coletado para posteriormente serem submetidos às técnicas de Western Blotting e dosagem de citocinas por ELISA.

4.7 – Ensaio de formação de poro e geração de anticorpo

A formação de poros em BMDMs foi determinada pela quantificação do influxo de iodeto de propídio como descrito anteriormente (Cerqueira et al., 2015). Os BMDMs

foram semeados em placas de 96 poços pretas de fundo transparente (1×10^5 células/poço), mantidos não primados ou pré-estimulados com LPS de *E. coli* (1 µg/ml) ou PAM3CSK (500 ng/ml) durante 4 ou 6 h, respectivamente. As células foram submetidas ao meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol (phenol-red) com 15 mM de HEPES e 0,38 g/l de NaHCO₃ suplementado com 10% (v/v) de FBS e 6 µg/ml de iodeto de propídio. Os BMDMs foram imediatamente infectados ou transfectados. As infecções foram realizadas com *B. abortus* selvagem em um MOI de 100 por 8 h ou 15 h. As transfecções com LPS de *B. abortus* foram realizadas utilizando o reagente de transfecção FuGENE®HD (Promega, Madison, EUA) como descrito acima e o influxo de iodeto de propídio foi quantificado durante 24 h. Durante a infecção/transfecção, as placas foram incubadas a 37°C no leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e a emissão de fluorescência do iodeto de propídio foi medida a cada 1 h. Durante as infecções, as bactérias foram opsonizadas com um anticorpo de camundongos policlonal (anti-*B. abortus*, diluição 1:1000) para garantir maior eficiência da fagocitose bacteriana. Este anticorpo policlonal foi gerado pela injeção de 1×10^6 bactérias mortas por calor/camundongo. Os animais foram injetados três vezes durante um intervalo de 15 dias; e após esse período, o soro de cada camundongo foi testado quanto à presença do anticorpo específico e armazenado a -80°C.

4.8 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas

Para a quantificação de citocinas, BMDMs foram plaqueados a uma densidade de 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços. Os BMDMs foram infectados com *B. abortus* ou com a cepa mutante *virB2* em um MOI de 100 ou transfectados com LPS de *B. abortus*, como descrito acima, por 17 h. Como controle positivo, as células foram pré-tratadas com 1 µg/ml de LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 4 h e estimuladas

com 20 μ M de nigericina (Sigma-Aldrich) por 30 min. Os sobrenadantes foram coletados e as citocinas foram quantificadas utilizando kits de ELISA de IL-1 β , IL-1 α , TNF- α e IL-12 de camundongos (R & D systems, Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante. Para a medição de KC, cinco camundongos de cada grupo (C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-}) foram infectados de forma intraperitoneal com 1x10⁶ UFC de *B. abortus* da cepa virulenta S2308 e sacrificados 2 semanas após a infecção. Fragmentos com aproximadamente 100 mg dos baços obtidos foram homogeneizados em 1 ml de solução de extração de citocinas (solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo um coquetel anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e Tween-20 a 0,05%) utilizando um homogeneizador de tecidos (T10 básico ULTRA-TURRAX, IKA, Alemanha). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e mantidos a 80°C para posterior quantificação de citocinas. O KC foi medido utilizando o kit de ELISA (R & D systems, Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 – Ensaio de liberação de lactato desidrogenase

Os BMDMs foram plaqueados em placas de 24 poços (5x10⁵ células/poço) e infectados com *B. abortus* a um MOI de 100. As infecções foram realizadas em meio DMEM sem vermelho de fenol (phenol-red). Após 8 h de infecção, os sobrenadantes foram coletados para análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pelas células mortas. A quantidade de LDH total foi determinada a partir da lise das culturas controle com Triton X-100. A presença da enzima LDH foi quantificada utilizando o kit de liberação de LDH CytoTox 96 (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante.

4.10 – Curvas de crescimento de *B. abortus* em BMDMs

Para determinação do crescimento bacteriano em macrófagos, BMDMs foram infectados com *B. abortus* selvagem (WT) com MOI 10 e centrifugadas a 270 g por 10 min, 25°C. Após 2 h de infecção, os poços foram lavados 3 vezes com solução salina 0,9% de NaCl para retirada das bactérias que não foram fagocitadas pelas células. Nesse momento e após 24, 48 e 72 h de infecção, os macrófagos foram lisados com 1 ml de água estéril. Diluições seriadas de cada poço foram plaqueadas em meio BB (*Brucella* Broth) sólido. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram obtidas a partir da contagem de colônias bacterianas presentes após 72 h de incubação a 37°C.

4.11 – Curvas de crescimento de *B. abortus* *in vivo*

Cinco camundongos de cada grupo (C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-}) foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com uma solução de 100 µL de salina 0,9% NaCl contendo 1x10⁶ UFCs de *B. abortus* da cepa virulenta S2308 e sacrificados após 72 h, 1 ou 2 semanas de infecção. Para os animais *Nlrp3*^{-/-}, *Casp11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg}, *Casp1/11*^{-/-}, a carga bacteriana foi avaliada após 2 semanas de infecção. Os baços foram retirados e macerados em 10 ml de solução salina (NaCl a 0,9%), diluídos de maneira seriada e plaqueados em duplicata em ágar Brucella Broth. Após 3 dias de incubação a 37°C, o número de UFCs foi determinado como descrito anteriormente (Macedo et al., 2008).

4.11 – Ensaio de *pull-down* para caspase-11 ativa

Os BMDMs foram cultivados em placas de 6 poços (5x10⁶ células/poço). As células foram pré-tratadas com o inibidor de caspases marcado com biotina Biotin-VAD-FMK (Enzo) na concentração final de 20 µM 15 min antes da infecção. Após esse tempo,

as células foram infectadas com *B. abortus* com MOI 100 ou transfectadas com LPS de *B. abortus* como descrito acima. Após 17 h de infecção, o lisado celular foi preparado com tampão de lise RIPA contendo inibidor de protease. As partículas esféricas de agarose conjugadas à estreptavidina (Streptavidin agarose) foram lavadas 2 vezes com tampão de lise RIPA sem inibidor de protease previamente ao seu uso. Em seguida, 400µl do volume das amostras iniciais foi adicionado às partículas esféricas e mantido sob agitação por pelo menos 4 h a 4°C. O restante do volume da amostra inicial foi guardado (*input*) para ser usado como controle. Após esse tempo, as amostras contendo as partículas esféricas foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Foram feitas 3 lavagens com tampão de lise RIPA. As amostras foram suspensas em 60 µl do tampão de amostra, fervidas por 10 min, centrifugadas e o sobrenadante coletado. As amostras resultantes do ensaio de *pull-down* foram submetidas à técnica de Western Blotting com anticorpo primário anti-caspase-11. Além disso, amostras do lisado antes do *pull-down* (*input*) foram incubadas com anticorpos específicos para caspase-11 e para a proteína constitutiva β-actina como controles.

4.12 – Western Blottings

Os BMDMs foram plaqueados a uma densidade de 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços. As células foram infectadas com *B. abortus* selvagem ou com a cepa mutante *virB2* em um MOI de 100 ou transfectadas com LPS de *B. abortus*, como descrito acima, por 17 h. Como controle positivo, as células foram pré-tratadas com 1 µg/ml de LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 4 h e estimuladas com nigericina a 20 µM (Sigma-Aldrich) por 30 min. Os sobrenadantes da cultura foram coletados e as células foram lisadas utilizando o Reagente de Extração de Proteínas de Mamífero M-PER (Thermo Fisher Scientific) suplementado com uma mistura de inibidores de protease na

concentração 1:100 (Sigma-Aldrich). Os lisados e os sobrenadantes de células foram submetidos à análise por SDS-PAGE e Western Blotting. As proteínas foram suspensas em tampão de amostra de Laemmli (Laemmli, 1970) e o conteúdo foi fervido por 10 min. As proteínas foram separadas utilizando gel de SDS-PAGE a 15% e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) em tampão de transferência (50 mM Tris, 40 mM glicina, 10% metanol). O bloqueio foi realizado nas membranas durante 1 h em TBS com 0,1% de Tween-20 contendo 5% de leite desnatado. As membranas foram incubadas durante a noite com anticorpos primários a 4°C. Os anticorpos primários utilizados incluíram um anticorpo monoclonal de camundongo contra a subunidade p20 da caspase-1 (Clone Casper-1) (Adipogen, San Diego, CA, EUA), um anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase-11 (Clone 4E11) (Adipogen, San Diego, CA, EUA) e um anticorpo monoclonal de rato anti-GSDMD (Genentech, linhagem celular GN20-13), ambos a uma diluição de 1:1000. O Western Blotting controle da quantidade de proteínas foi realizado utilizando o anticorpo monoclonal de coelho anti- β -actina (Clone 13E5) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) na diluição de 1:1000. As membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 min utilizando TBS com 0,1% de Tween 20 e incubadas durante 1 h a 25°C com o anticorpo secundário conjugado a HRP apropriado a uma diluição de 1:1000. As bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o substrato de HRP quimioluminescente luminol (Millipore) e analisadas utilizando o software ImageQuant TL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

4.13 – PCR em tempo real

O RNA foi extraído a partir de BMDMs utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) a fim de isolar o RNA total seguindo as instruções do fabricante. A

transcrição reversa de 2 µg do RNA total foi realizada usando as microesferas de RT-PCR Illustra Ready-To-Go (GE Healthcare, Chicago, IL) de acordo com as instruções do fabricante. A RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando o SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio3 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os primers apropriados foram utilizados para amplificar um fragmento específico correspondente aos seguintes alvos genéticos específicos:

Tabela 1: Primers utilizados na PCR em tempo real.

Gene	forward	reverso
β-actina	5'GGCTGTATTCCCCTCCATCG3'	5'CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'
GBP1	5'GAGTACTCTCTGGAAATGGCC TCAGAAA3'	5'TAGATGAAGGTGCTGCTGAGGA GGACTG3'
GBP2	5'CTGCACTATGTGACGGAGCTA 3'	5'CGGAATCGTCTACCCCACTC3'
GBP3	5'CTGACAGTAAATCTGGAAGC CAT3'	5'CCGTCCTGCAAGACGATTCA3'
GBP4	5'GGAGAAGCTAACGAAGGAAC AA3'	5'TTCCACAAGGGAATCACCATTTT 3'
GBP5	5'CTGAACTCAGATTTTGTGCAG GA3'	5'CATCGACATAAGTCAGCACCAG 3'
GBP7	5'TCCTGTGTGCCTAGTGGAAAA 3'	5'CAAGCGGTTTCATCAAGTAGGAT 3'

Todos os dados são apresentados como unidades de expressão relativa após a normalização para o gene da β -actina e as medições foram realizadas em triplicata.

4.14 – Silenciamento com siRNA

Os BMDMs foram previamente tratados com PAM3CSK (500 ng/ml) e após 6 h, foram transfectados com siRNA da siGENOME SMARTpools (Dharmacon, Lafayette, CO) utilizando o reagente de transfecção GenMute siRNA de acordo com as instruções do fabricante (SignaGen, Rockville, MD). Os siRNAs siGENOME SMARTpool específicos para GBP1 (M-040198010005, GBP3 (M-063076-01-0005), GBP5 (M-054703-01-0005) e GBP7 (M-061204-01-0005) de camundongos foram utilizados neste estudo. Foi utilizado como controle um pool de siRNA (D-001206-14-05). Quarenta e seis horas após a transfecção do siRNA, as células foram transfectadas com LPS de *B. abortus* (5 μ g/ml) como descrito acima. Após 17 h, o sobrenadante foi coletado para quantificação de IL-1 β por ELISA e da liberação de LDH utilizando o kit CytoTox 96 (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante.

4.15: Análise de citometria de fluxo

Cinco camundongos de cada grupo (C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-}) foram infectados i.p. com 1×10^6 UFCs de *B. abortus* da cepa virulenta S2308 e sacrificados 2 semanas após a infecção. As células do baço foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS estéril. Após a lavagem, as células foram ajustadas para 1×10^6 células em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 150 U de penicilina e 150 μ g de sulfato de estreptomicina por poço numa placa de 96 poços. Depois, as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 7 min a 4°C e lavadas com PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (PBS/BSA). As células foram incubadas com anti-CD16/CD32

(FcBlock) (1:30 diluído em PBS/BSA) durante 20 min a 4°C. As células foram depois centrifugadas e lavadas em PBS/BSA e incubadas durante 20 min a 4°C com uma mistura dos seguintes anticorpos: IgG2a de rato anti-murino F4/80 conjugado com biotina (clone BM8; 1:200); IgG2b de rato anti-murino CD11b conjugado com APC-Cy7 (clone M1/70; 1:200); IgG1 de hamster anti-murino CD11c conjugado com FITC (clone HL3; 1:200); IgG2a de rato anti-murino Ly-6G conjugado com PE (clone 1A8; 1:200) e IgG2a de rato anti-murino CD62L conjugado com APC (clone MEL-14; 1:400). Todos os anticorpos foram obtidos da BD Bioscience. As células foram centrifugadas e lavadas novamente com PBS/BSA e incubadas com estreptavidina conjugada com PerCP Cy5.5 (1:30) durante 20 min a 4°C. Para quantificar a IL-17, as células foram centrifugadas, lavadas novamente com PBS/BSA e fixadas e permeabilizadas usando o reagente BD Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então incubadas com o anticorpo anti-IL-17 IgG2a de rato anti-murino conjugada com PE (clone eBio 18F10; 1:30; eBioscience) durante 30 min a 4°C. Por fim, as células foram lavadas três vezes, suspensas em tampão PBS e avaliadas utilizando equipamento Attune Acoustic Focusing (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os resultados foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.16: Microscopia confocal

Camundongos C57BL/6, *Casp11^{-/-}* e *Gsdmd^{-/-}* foram infectados com *B. abortus* como previamente descrito, e 3 dias após a infecção foram inoculados intravenosamente (i.v.) com uma dose única de 8 µg de anticorpo Ly-6G PE (clone 1A8; 1:200, BD Bioscience) para cada 20 g do camundongo. Após 2 h, os baços foram extraídos e foi realizada a análise de microscopia confocal *ex vivo* do órgão inteiro usando um sistema

confocal Nikon A1. Três animais por grupo foram analisados, e as imagens foram tiradas usando uma objetiva de 4x para dez campos aleatórios por camundongo. A porcentagem de pixels fluorescentes vermelhos foi analisada por área de órgão por campo usando o software ImageJ.

4.17: Ensaio de aumento extracelular de $[K^+]$ e quantificação do efluxo de K^+

Para o ensaio de aumento extracelular da concentração de K^+ , os BMDMs foram plaqueados a uma densidade de 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços. Os BMDMs foram incubados em um meio contendo 80 mM de KCl 1 h antes da infecção. Em seguida, os BMDMs foram infectados com *B. abortus* em um MOI de 100 no mesmo meio por 17 h e a partir do sobrenadante coletado dessas células, a citocina IL-1 β foi quantificada. A concentração intracelular de K^+ foi determinada por emissão de fluorescência da sonda de potássio Asante Potassium Green-2 (APG-2, TEFLabs, Austin, EUA). Resumidamente, BMDMs (2×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços pretas de fundo transparente e infectadas com *B. abortus* em um MOI de 100. Após 6 h de infecção, as células foram incubadas com 5 μ M de APG-2 em meio RPMI sem SFB e sem vermelho de fenol durante 30 min. Os BMDMs foram lavados com PBS e o meio foi substituído por RPMI sem vermelho de fenol. Quatro imagens por poço foram gravadas com ampliação de 40x utilizando o ImageXpress Micro High-Content Imaging System e processadas com o MetaXpress High-Content Image Acquisition e Analysis (Molecular Devices). As imagens foram analisadas usando o software ImageJ, e a concentração de K^+ intracelular em cada célula foi calculada como uma porcentagem: $MFI_{540nm}(\text{célula inquirida}) / \Sigma MFI_{540nm}(\text{células controle}) \times 100$.

4.18: Depleção de neutrófilos

Os neutrófilos foram depletados por injeção intraperitoneal de 100 µg de anticorpo anti-Ly6G de camundongo (clone 1A8, BioXcell, West Lebanon, NH, EUA) 24 h antes da infecção. A infecção foi realizada intraperitoneal com 1×10^6 UFCs de *B. abortus* da cepa virulenta de S2308. A depleção de neutrófilos foi mantida com aplicações de anticorpos anti-Ly6G de camundongo em intervalos de 2 dias entre cada dose durante um total de 7 dias. Nestes experimentos, 100 µg de um anticorpo controle de isotipo (IgG de soro de rato, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram administrados como controle. Após 1 semana de infecção, os camundongos foram sacrificados, os baços foram coletados e a contagem de UFCs foi realizada como descrito acima. A depleção de neutrófilos foi confirmada por análise de citometria de fluxo a partir de células de baço de camundongos depletados e controle. A população de neutrófilos foi analisada por marcação de 1×10^6 células durante 30 min a 4°C com anticorpos fluorescentes anti-Ly6G (PE, clone 1A8, BD Biosciences). As células marcadas foram adquiridas no Citômetro de Fluxo Attune (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) e analisadas utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

4.19 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste t de Student não pareado foi usado para comparar dois grupos. One-way ANOVA seguido por múltiplas comparações de acordo com o procedimento de Tukey foi usado para comparar três ou mais grupos. Salvo indicação em contrário, os dados são expressos como a média \pm SD. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com um valor de $p < 0,05$.

5- Resultados

5.1 – A produção de IL-1 β e a ativação de caspase-1 em resposta a *B. abortus* são dependentes de NLRP3, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV

Recentemente, Kayagaki e colaboradores observaram que animais deficientes em caspase-1 construídos em 1995 (Kuida et al., 1995) também eram deficientes em caspase-11 (Kayagaki et al., 2011). Essa descoberta levou à necessidade de definir se há participação de caspase-11 nas respostas até então atribuídas a caspase-1. Para tanto, eles construíram camundongos *Casp11^{-/-}* e camundongos transgênicos *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}*, os quais nós utilizamos nesse trabalho. Os camundongos transgênicos *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}* foram gerados a partir da microinjeção de uma construção do cromossomo artificial bacteriano (BAC) contendo o gene para caspase-11 em embriões duplo deficientes em caspase-1 e caspase-11 (*Casp1/11^{-/-}*), originando camundongos deficientes apenas em caspase-1. Como esses animais são transgênicos, e, portanto, heterozigotos, para gerar a prole eles são cruzados com animais duplo deficientes em caspase-1 e caspase-11 (*Casp1/11^{-/-}*). Dessa forma, somente aproximadamente 50% dos filhotes são heterozigotos possuindo o gene para caspase-11. Dado esse fato, em toda prole gerada há a necessidade de realizar a genotipagem para separação dos animais transgênicos *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}* dos duplo-deficientes em caspase-1 e caspase-11 (*Casp1/11^{-/-}*).

Realizamos os cruzamentos entre camundongos *Casp1/11^{-/-}* e *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}* e genotipamos a prole a fim de observar a presença/ausência de caspase-11 através da técnica de PCR com iniciadores específicos para a construção BAC contendo caspase-11. Como controle da presença de DNA nas amostras dos animais, realizamos a amplificação do gene não relacionado conhecido como TCRD, o qual codifica a cadeia delta do receptor de célula T e está presente em todos os camundongos. Como controle positivo e

negativo da reação, foi utilizado DNA de animais sabidamente *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}* e de animais sabidamente *Casp1/11^{-/-}*, respectivamente. Como controle geral negativo do PCR, utilizamos água ao invés de DNA. Em um experimento representativo (Fig. 5), observamos que dos 9 animais genotipados, 5 foram positivos para presença de caspase-11, bem como o animal controle positivo. Dessa forma, foi observada proporção aproximada de 50% de animais transgênicos. Como esperado, no PCR controle para o gene TCRD, todos os 9 animais apresentaram banda, bem como os animais controle positivo e negativo. Além disso, o controle negativo geral da reação não apresentou banda com nenhum dos pares de iniciadores.

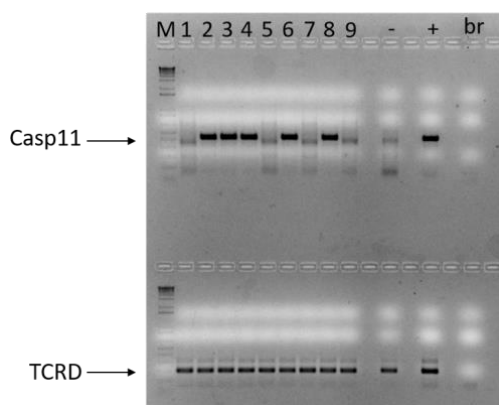


Figura 5: Genotipagem dos animais *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}*. As biópsias de orelhas dos camundongos foram coletadas, tiveram seu DNA extraído e foram submetidas à reação de PCR (1-9). Em uma das reações, foi utilizado o par de iniciadores capaz de amplificar caspase-11. Na reação controle, foi utilizado um par de iniciadores que amplifica o gene TCRD, o qual é constitutivo em camundongos. Como controle positivo (+) e negativo (-) da reação, foi utilizado DNA de animais sabidamente *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}* e de animais sabidamente *Casp1/11^{-/-}*, respectivamente. Como controle da reação (branco), foi utilizado água ao invés de DNA em uma das amostras. M: marcador; br: branco.

Uma vez selecionados os animais deficientes somente em caspase-1 (*Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}*), fomos investigar a dependência de caspase-1 e caspase-11 nas respostas do inflamassoma de NLRP3 a *B. abortus*. *B. abortus* selvagem é capaz de infectar macrófagos selvagens levando à ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β e IL-18, de forma dependente de NLRP3 (Gomes et al., 2013). Dessa forma, fomos investigar se a secreção de IL-1 β por macrófagos infectados com essa bactéria selvagem era dependente

de caspase-11. Para tanto, infectamos BMDMs primados e não primados das linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} com *B. abortus* selvagem. Além disso, infectamos esses macrófagos com *B. abortus* mutante *virB*, a fim de avaliar a importância do sistema de secreção tipo IV *virB* para a secreção de IL-1 β . Como controle, os macrófagos foram tratados com nigericina, a qual atua como agonista canônico de NLRP3. Após 50 min de tratamento com nigericina e 17 h de infecção com *B. abortus*, foi avaliada a produção de IL-1 β no sobrenadante das células.

Observamos que BMDMs da linhagem selvagem tanto primados quanto não primados foram capazes de produzir IL-1 β em resposta à infecção por *B. abortus*, demonstrando a capacidade da própria bactéria em pré-estimular os macrófagos (Fig. 6A-B). BMDMs de camundongos *Casp11*^{-/-} quando infectados com *B. abortus* selvagem e com a mutante Δ *virB* secretaram quantidades reduzidas de IL-1 β em comparação com BMDMs de camundongos C57BL/6. Já BMDMs das linhagens *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp1/11*^{-/-} não secretaram quantidades significativas de IL-1 β . Além disso, nos controles não infectados não foi observada secreção de IL-1 β , conforme esperado. Quando BMDMs da linhagem C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* mutante em Δ *virB* foi observada uma redução na secreção de IL-1 β em relação aos infectados com bactérias selvagens. Esses dados sugerem que a secreção de IL-1 β ocorre de maneira dependente de NLRP3, caspase-1, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV *virB*. Ademais, como BMDMs da linhagem *Nlrp3*^{-/-} não secretaram quantidades significativas de IL-1 β , enquanto BMDMs *Casp11*^{-/-} ainda apresentam uma produção residual de IL-1 β , acreditamos que *B. abortus* seja capaz de ativar o inflamassoma de NLRP3 tanto de maneira não canônica (dependente de caspase-11) quanto canônica (independente de caspase-11).

O tratamento controle com nigericina foi realizado a fim de observar a capacidade dos macrófagos em responder adequadamente a um estímulo cuja resposta já é conhecida. Observamos que, como esperado, macrófagos de todas as linhagens não primados foram incapazes de secretar IL-1 β , devido à ausência do primeiro sinal, o qual é necessário para expressão de NLRP3 e pró-IL-1 β . Já os macrófagos primados das linhagens C57BL/6 e *Casp11*^{-/-} secretaram níveis similares de IL-1 β , enquanto macrófagos *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg}, *Casp1/11*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} foram incapazes de secretar IL-1 β em resposta a nigericina, como esperado.

Além disso, para investigar se a falta de caspase-11 ou caspase-1 poderia interferir nas citocinas independentes do inflamassoma, os níveis de IL-12 e TNF- α foram medidos nos sobrenadantes dos macrófagos infectados com *Brucella*. Como observado na Fig. 6C, os macrófagos *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} infectados produziram níveis semelhantes dessas citocinas quando comparados com células de camundongos do tipo selvagem.

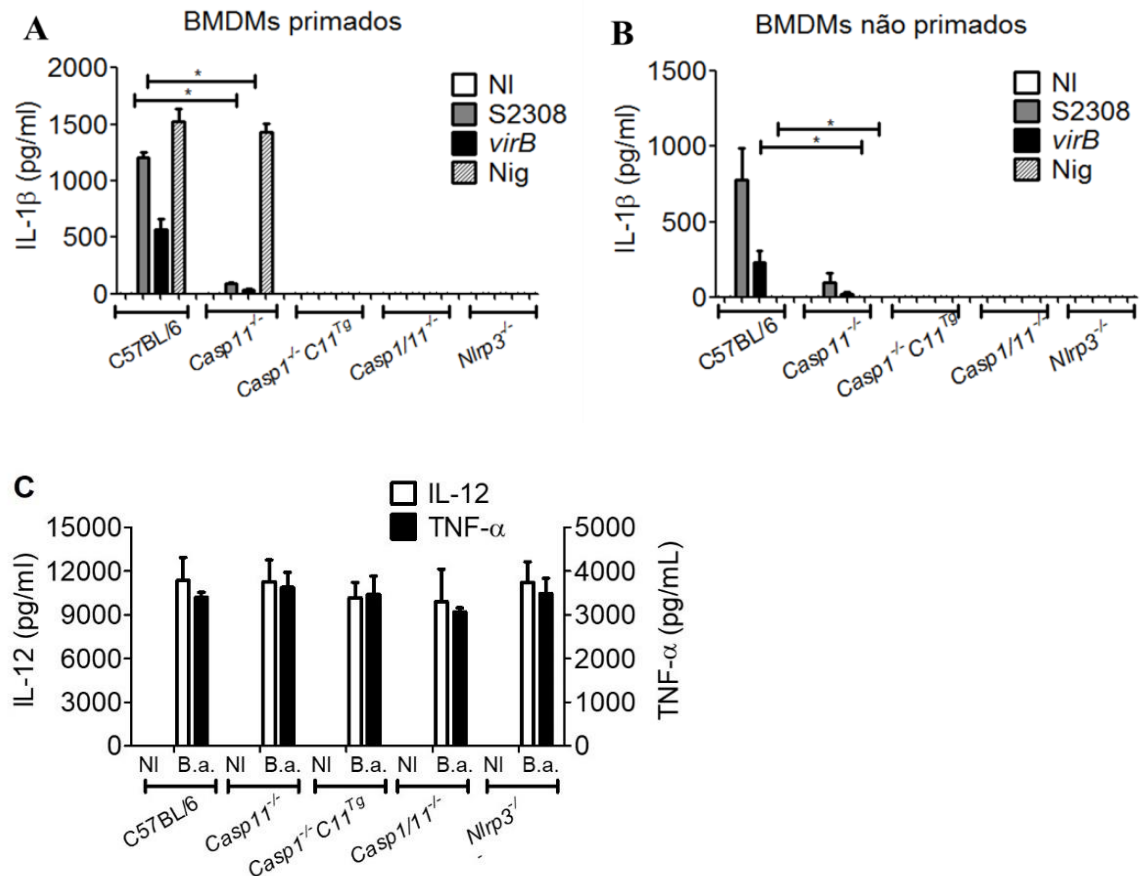


Figura 6: A produção de IL-1 β em resposta a *B. abortus* é dependente de NLRP3, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV. (A-B) BMDMs primados (A) e não primados (B-C) com LPS de *E. coli* (1 μ g/ml) obtidos de camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*C11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} permaneceram não infectados (NI) ou foram estimulados com *B. abortus* S2308 ou mutante Δ *virB* com MOI 100 por 17 h de infecção ou tratadas com nigericina (20 μ M) por 50 min. O sobrenadante foi coletado e submetido ao ELISA a fim de estimar a concentração de IL-1 β , IL-12 e TNF- α . Os dados mostram a média \pm o desvio padrão de triplicatas. Teste T: *p<0.05.

B. abortus selvagem leva à ativação de caspase-1, de forma dependente de NLRP3 (Gomes et al., 2013). Dessa forma, avaliamos se essa ativação de caspase-1 é dependente de caspase-11. Infectamos BMDMs das linhagens selvagem, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp11*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-} e *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} não primados e primados com LPS com *B. abortus* selvagem e mutante *virB*. Como controle, tratamos as mesmas linhagens de BMDMs com nigericina. Após 17 h de infecção com *B. abortus* e 50 min de tratamento com nigericina, o sobrenadante das células foi coletado e o lisado devidamente preparado para ser submetido à técnica de Western Blotting. Posteriormente, o sobrenadante foi submetido

à técnica de Western Blotting utilizando anticorpo específico anti-caspase-1. Como controle, o lisado foi incubado com anticorpos específicos para caspase-1 e para a proteína constitutiva β -actina.

A partir do resultado do Western Blotting, observamos que quando macrófagos *Casp11*^{-/-} foram infectados com *B. abortus* selvagem, houve uma redução nos níveis de ativação de caspase-1 em comparação com macrófagos selvagens da linhagem C57BL/6 (Fig. 7A-B). Assim como na secreção de IL-1 β , macrófagos *Casp11*^{-/-} apresentaram níveis residuais de ativação de caspase-1, ao passo que macrófagos *Nlrp3*^{-/-} foram incapazes de ativar caspase-1 em resposta a *B. abortus* selvagem, demonstrando mais uma vez que *B. abortus* é capaz de ativar o inflamassoma de NLRP3 de maneiras canônica e não canônica. Quando os macrófagos foram infectados com *B. abortus* mutante *virB*, não observamos ativação de caspase-1 por nenhuma das linhagens devido à importância do sistema de secreção do tipo IV para a ativação de caspase-1 pelos macrófagos. Como esperado, os macrófagos *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp1/11*^{-/-} não apresentaram expressão de caspase-1 quando infectados com *B. abortus* selvagem ou mutante *virB*. Além disso, nos controles não infectados de todas as linhagens não foi observada ativação de caspase-1, conforme esperado. Esses dados foram observados em macrófagos tanto primados (Fig. 7A) quanto não primados (Fig. 7B) devido à capacidade da própria bactéria em fornecer o primeiro sinal aos macrófagos. Ademais, observamos a partir da expressão de pró-caspase-1 e β -actina que havia quantidade similar de proteína em todos os grupos. Esses dados demonstraram que a ativação de caspase-1 em resposta a *B. abortus* ocorre de maneira dependente de caspase-11, NLRP3 e do sistema de secreção do tipo IV *virB*.

No tratamento controle com nigericina, como esperado, os macrófagos não primados foram incapazes de ativar caspase-1 em resposta ao estímulo (Fig. 7C). Ao passo que macrófagos primados das linhagens C57BL/6 e *Casp11*^{-/-} foram capazes de

ativar caspase-1 em resposta a nigericina. Macrófagos *Nlrp3*^{-/-}, assim como os não tratados, foram incapazes de ativar caspase-1. Como esperado, não foi observada expressão de caspase-1 nos controles *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp1/11*^{-/-}.

Como forma de confirmar a expressão de caspase-11 pelos animais, infectamos BMDMs primados e não primados das linhagens C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-} e *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} com *B. abortus* e observamos a expressão de caspase-11 nos lisados após 17 h de infecção pela técnica de Western Blotting. Como observado, para haver a expressão de caspase-11 foi necessário pré-tratamento com LPS ou infecção com *B. abortus* (Fig. 7D). Dessa forma, macrófagos das linhagens C57BL/6 e *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} quando primados ou quando infectados com *B. abortus* seja não primados ou primados, apresentaram expressão de caspase-11. Além disso, como esperado macrófagos das linhagens *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} não apresentaram expressão de caspase-11. Além disso, a partir da marcação controle para β -actina, observamos que todas as linhagens possuíam a mesma quantidade de células tanto não primadas quanto primadas.

Coletivamente, esses dados demonstraram que *B. abortus* é capaz de levar à ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β de maneira dependente de NLRP3, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV *virB*.

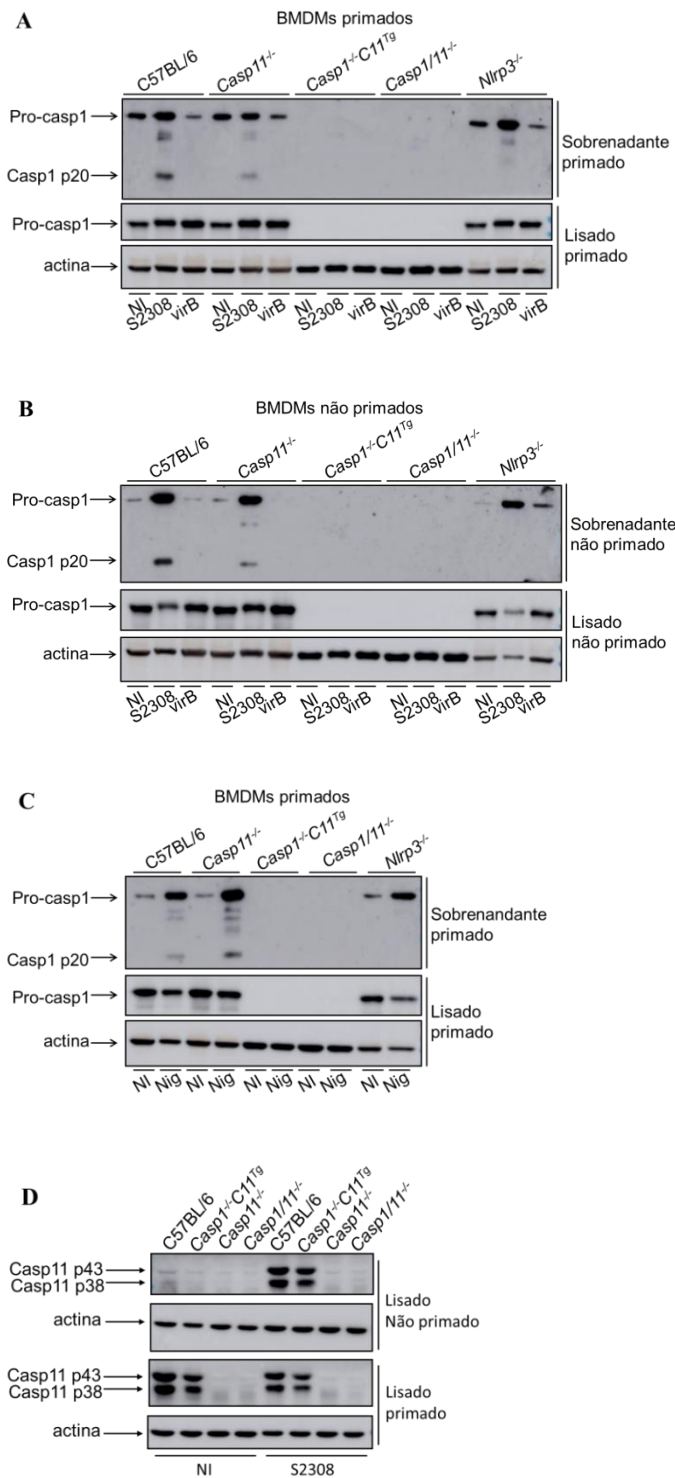


Figura 7: A ativação de caspase-1 em resposta a *B. abortus* é dependente de NLRP3, caspase-11 e do sistema de secreção do tipo IV. BMDMs foram obtidos de animais das linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*C11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-}. (A-D) BMDMs (A;C;D) primadas e (B;D) não primadas com LPS de *E. coli* (1µg/ml) permaneceram não infectados (NI) ou foram estimulados com (A;B;D) *B. abortus* S2308 ou (A;B) mutante $\Delta virB$ com MOI 100 por 17 h de infecção ou (C) tratadas com nigericina (20 µM) por 50 min. O sobrenadante e o lisado foram coletados, separados por SDS-PAGE e submetidos a Western Blotting. (A-C) Os sobrenadantes foram marcados com o anticorpo primário monoclonal anti-caspase-1 p20 e os lisados com anticorpo primário monoclonal anti-caspase-1 p20 ou com o anti-β-actina. (D) Os lisados de BMDMs não primados e primados foram marcados com o anticorpo primário anti-caspase-11 p38/p43 ou com o anti-β-actina.

5.2 – A transfecção do LPS de *B. abortus* leva à produção de IL-1 β e ativação de caspase-1 de maneira dependente de NLRP3 e caspase-11

Um estudo anterior sugeriu que a caspase-11 atua como um receptor de intracelular de LPS (Shi et al., 2014). Uma vez que reconhece o LPS no citosol, a caspase-11 é ativada desencadeando a piroptose e a secreção de IL-1 α . Além disso, a caspase-11 é capaz de desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3/ASC, levando ao processamento de caspase-1 e secreção de IL-1 β (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2013; Shi et al., 2014). Dessa forma, analisamos se o LPS de *B. abortus* diretamente transfectado no citosol de macrófagos era capaz de desencadear a ativação da caspase-1 e a secreção de IL-1 β . Para isso, BMDMs de camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} foram transfectados com LPS de *B. abortus* purificado e após 17 horas de transfecção, quantificamos a produção de IL- β e a ativação de caspase-1 no sobrenadante celular. Observamos que os BMDMs de camundongos C57BL/6 foram capazes de produzir altos níveis de IL-1 β em resposta ao LPS citoplasmático (Fig. 8A). Em contraste, os BMDMs de camundongos *Casp11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-} *Casp11*^{Tg}, *Casp1/11*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} secretaram baixos níveis de IL-1 β semelhante às células controle tratadas apenas com o reagente de transfecção FuGENE[®]HD. Esses dados sugerem que o LPS de *B. abortus* é reconhecido pela caspase-11 no citosol dos macrófagos e leva à secreção de IL-1 β dependente de NLRP3, caspase-1 e caspase-11.

Além disso, investigamos se o LPS de *B. abortus* era capaz de desencadear a ativação da caspase-1 de maneira dependente da caspase-11. Os BMDMs de camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} foram transfectados com LPS de *B. abortus*. Após 17 horas de transfecção, os sobrenadantes das células foram coletados e os lisados foram preparados para imunoblotting utilizando

anticorpo específico para a subunidade p20 de caspase-1. Observamos que os macrófagos do tipo selvagem transfectados diretamente com o LPS de *B. abortus* ativaram caspase-1 (Fig. 8B). Em contraste, os BMDMs de camundongos *Nlrp3^{-/-}* e *Casp11^{-/-}* não foram capazes de ativar a caspase-1 em resposta ao LPS de *B. abortus*. Como esperado, os BMDMs de camundongos *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}* e *Casp1/11^{-/-}* não expressaram caspase-1. Além disso, a ativação de caspase-1 não foi observada nos controles não tratados e nos tratados somente com o reagente de transfecção FuGENE[®]HD, como esperado. Estes dados sugerem que a ativação de caspase-1 em resposta ao LPS de *B. abortus* é dependente de caspase-11 e NLRP3. Coletivamente, esses dados demonstraram que o LPS de *B. abortus* é o PAMP responsável pela ativação do inflamassoma não-canônico de caspase-11 quando reconhecido por caspase-11 no citosol dos macrófagos.

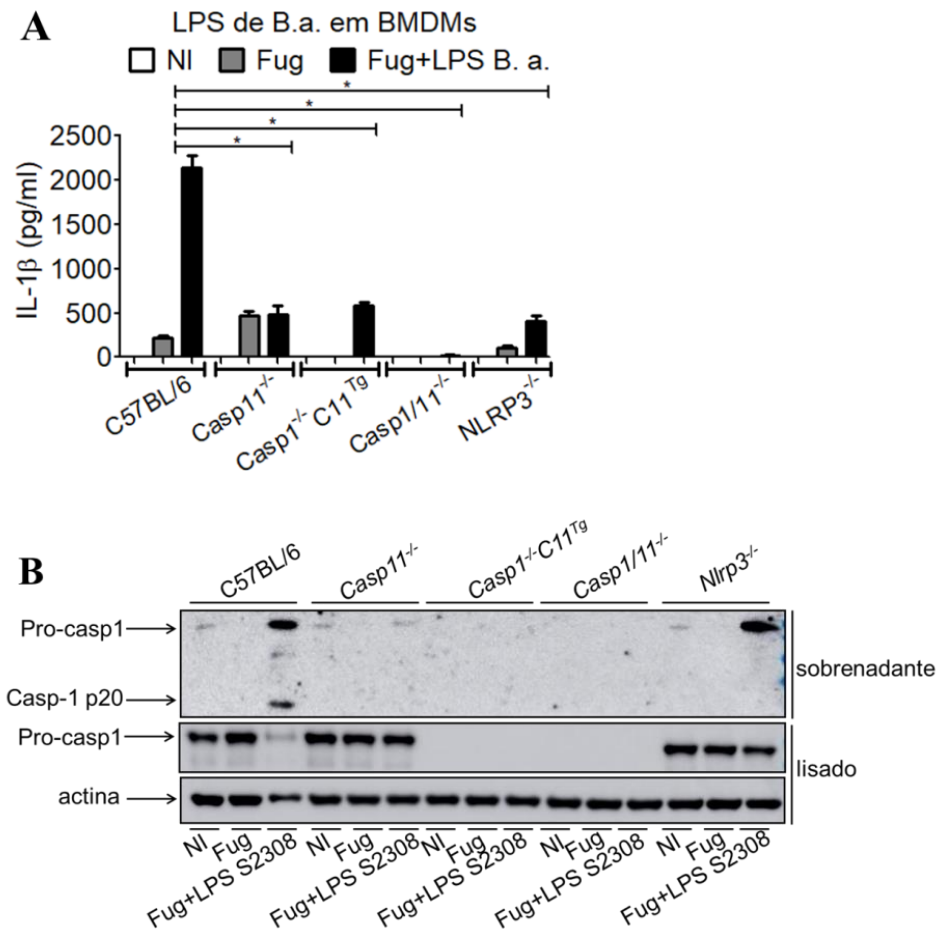


Figura 8: A transfecção do LPS de *B. abortus* desencadeia a produção de IL-1 β e ativação de caspase-1 de maneira dependente de NLRP3 e caspase-11. BMDMs primados das linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*C11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} foram mantidos não transfectados (NI) ou transfectados com FuGENE®HD ou FuGENE®HD acrescido do LPS (5 μ g/ml) de *B. abortus* S2308 por 17 h. Após esse tempo, o sobrenadante e o lisado foram coletados. (A) O sobrenadante foi submetido a ELISA para estimar a concentração de IL-1 β . (B) O sobrenadante e o lisado foram separados por SDS-PAGE e submetidos a Western Blotting. O sobrenadante foi marcado com anticorpo monoclonal anti-caspase-1 p20 e o lisado foi marcado com o anticorpo primário anti-caspase-1 p20 ou com o anti- β -actina. Os dados mostram a média \pm o desvio padrão de triplicatas. Teste T: * p <0.05 em relação a C57BL/6.

5.3 – *B. abortus* selvagem leva à piroptose e secreção de IL-1 α em BMDMs de maneira dependente de caspase-11 e independente de caspase-1 e NLRP3

Uma das respostas induzidas por caspase-11 é a morte celular pró-inflamatória conhecida como piroptose, a qual ocorre de maneira independente de NLRP3/caspase-1 (Kayagaki et al., 2011). Os dados desse presente trabalho demonstraram que *B. abortus* leva à ativação do inflamassoma não-canônico de caspase-11, visto que ela induz a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β de maneira dependente de caspase-11. Dessa

forma, como ela ativa caspase-11, fomos investigar se *B. abortus* 2308 é capaz de induzir a formação de poro de maneira dependente de caspase-11.

Para isso, BMDMs não primados e primados das linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} foram cultivados em meio contendo iodeto de propídeo (PI) e infectados com *B. abortus* selvagem. Como controle, BMDMs primados foram tratados com nigericina, a qual atua como agonista de NLRP3 e indutora de poros na membrana. O iodeto de propídeo é uma molécula que intercala no DNA emitindo fluorescência. Dessa forma, uma vez que há dano na membrana celular como a formação de poros, o iodeto de propídeo penetra na célula e é capaz de se intercalar na dupla fita de DNA. Desta forma, células com membranas plasmáticas intactas, não são permeáveis ao composto. Enquanto células com algum tipo de dano na membrana ou poro permitem o influxo do composto. Dessa forma, em células com poros na membrana é possível a quantificação de fluorescência emitida (unidades relativas de fluorescência – RFU) pelo iodeto de propídeo em um fluorímetro (SpectraMax i3 – Molecular Devices). As leituras foram adquiridas pelo equipamento a cada 5 min.

A partir da análise dos dados obtidos, observamos que tanto em BMDMs não primadas quanto primadas derivadas de animais selvagens, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Nlrp3*^{-/-} ocorreu formação de poros em resposta à infecção por *B. abortus* selvagem (Fig. 9A-J). Ao passo que em BMDMs derivados de animais *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} não foi observada a formação de poros. Como esperado, não houve formação de poros nos controles não infectados. BMDMs das linhagens selvagem e *Casp11*^{-/-} foram capazes de formar poro em resposta ao tratamento controle com nigericina (Fig 9K). Entretanto, BMDMs das linhagens *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp1/11*^{-/-} foram incapazes de formar poros, como esperado. Coletivamente, nossos dados sugerem que *B. abortus* é capaz de levar à

formação de poros em BMDMs de maneira dependente de caspase-11 e independente de caspase-1 e NLRP3.

Além da formação de poros, caspase-11 de maneira independente de NLRP3/caspase-1 é capaz de levar à liberação de IL-1 α (Kayagaki et al., 2011). Dessa forma, avaliamos a importância de caspase-11 para a liberação de IL-1 α em resposta à infecção por *B. abortus*. Para tanto, infectamos BMDMs primados das linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} com *B. abortus* selvagem. Após 17 h de infecção foi avaliada a liberação de IL-1 α no sobrenadante das células infectadas por *B. abortus*.

Observamos que BMDMs das linhagens *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} e *Nlrp3*^{-/-} liberaram quantidades semelhantes de IL-1 α no sobrenadante em comparação com BMDMs da linhagem selvagem (Fig. 10). Entretanto, BMDMs das linhagens *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} liberaram quantidades reduzidas de IL-1 α em comparação com BMDMs da linhagem selvagem. Como esperado, BMDMs não infectados foram incapazes de liberar IL-1 α . Dessa forma, esses dados sugerem que caspase-11 é importante para a liberação de IL-1 α por macrófagos em resposta à infecção por *B. abortus*.

Coletivamente, esses dados sugerem que *B. abortus* é capaz de levar à piroptose e à liberação de IL-1 α em macrófagos de maneira dependente de caspase-11 e independente de NLRP3 e caspase-1.

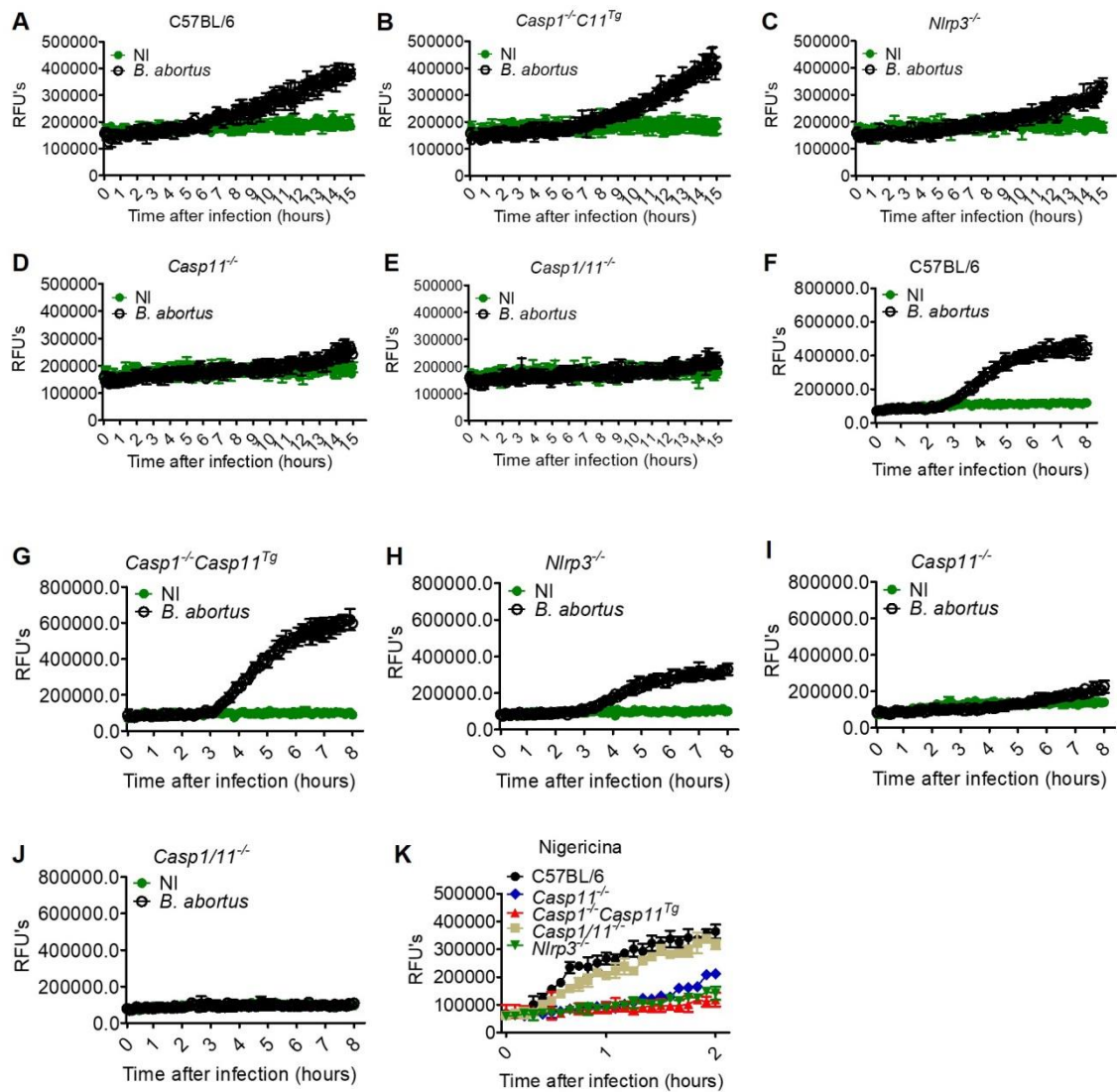


Figura 9: A piroptose em resposta a *B. abortus* é dependente de caspase-11, mas independente de NLRP3 e caspase-1. BMDMs das linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}*C11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} foram mantidas não infectadas (NI) ou estimuladas com *B. abortus* com MOI 100. A formação de poro em resposta a *B. abortus* (A–J) ou tratamento com nigericina (K) em BMDMs não primadas (A–E) e primadas (F–K) foi quantificada fluorimetricamente em tempo real pelo influxo de iodeto de propídeo (unidades relativas de fluorescência – RFUs).

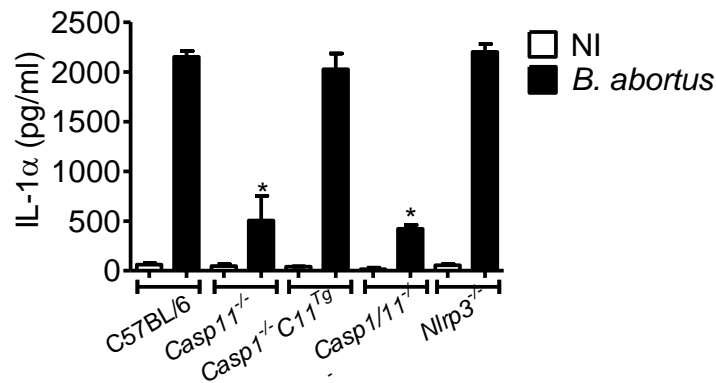


Figura 10: A secreção de IL-1 α em resposta a *B. abortus* é dependente de caspase-11, mas independente de NLRP3 e caspase-1. BMDMs das linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-} *C11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-} foram pré-estimuladas com LPS de *E. coli* e mantidas não infectadas (NI) ou infectadas com *B. abortus* S2308 com MOI 100. BMDMs permaneceram não infectadas (NI – barras brancas) ou estimuladas *B. abortus* S2308 (barras pretas) com MOI 100 por 17 h. O sobrenadante foi coletado e submetido ao ELISA para estimar a concentração de IL-1 α . Os dados mostram a média \pm o desvio padrão de triplicatas. Teste T: *p<0.05 em relação a C57BL/6.

5.4 – As proteínas ligadoras de guanilato (GBPs) são requeridas para a piroptose e ativação de caspase-11 em resposta a *B. abortus*

As GBPs são GTPases indutíveis por interferon que atuam tanto na ruptura das membranas de patógenos vacuolares quanto facilitando a interação intracelular do LPS com caspase-11 para ativar o inflamassoma não-canônico, principalmente quando o LPS se encontra em membranas lipossomais ou em membranas externas bacterianas (Meunier et al., 2014; Pilla et al., 2014; Santos et al., 2018). Uma vez no citosol, o LPS dessas bactérias pode ser reconhecido pelo receptor intracelular levando à ativação de caspase-11. Uma vez ativa, caspase-11 leva à ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β de maneira dependente de NLRP3 e à piroptose de maneira independente de NLRP3/caspase-1. Portanto, hipotetizamos que as GBPs participam da ativação do inflamassoma não-canônico por *B. abortus*. Dessa forma, avaliamos a participação das GBPs na formação de poros em resposta a *B. abortus*. Para avaliar o papel das GBPs, infectamos BMDMs das linhagens C57BL/6 (selvagens), *Gbp*^{chr3-/-} (deficiente para o

locus que codifica as GBP1, GBP2, GBP3, GBP5 e GBP7 no cromossomo 3 de camundongos), *Gbp2*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} com *B. abortus*. Avaliando o influxo de iodeto de propídio em tempo real durante 8h de infecção, observamos que macrófagos deficientes em GBP2 foram capazes de formar poros de forma semelhante aos macrófagos selvagens (Fig. 11A-C). Entretanto, macrófagos deficientes nos GBPs do cromossomo 3 foram incapazes de formar poro semelhante ao que é visto em macrófagos duplo-deficientes em caspase-1/caspase-11. Como esperado, macrófagos não infectados de todas as linhagens foram incapazes de formar poro. Além disso, como controle, tratamos BMDMs C57BL/6, *Gbp*^{chr3-/-}, *Gbp2*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} com nigericina e avaliamos o influxo de iodeto de propídeo em tempo real durante 2h de tratamento. Observamos que macrófagos deficientes em GBP2 e nas *GBP*^{chr3} foram capazes de formar poro de maneira semelhante aos macrófagos selvagens em resposta a nigericina. Ao passo que macrófagos deficientes em caspase-1/caspase-11 foram incapazes de formar poro em resposta a nigericina, como esperado. Esses dados sugerem que as GBPs do cromossomo 3, mas não o GBP2, são críticos para a formação de poro induzida por *B. abortus*.

Como o processo de formação de poro é desencadeado pela caspase-11 ativa, investigamos se as GBPs do cromossomo 3 eram necessárias para a ativação de caspase-11. Para isso, BMDMs das linhagens C57BL/6 e *Gbp*^{chr3-/-} foram pré-tratadas com um inibidor de caspases marcado com biotina (Biotin-VAD-FMK) e, após 15 min, infectadas com *B. abortus* por 17 h. Esse inibidor se liga no sítio ativo das caspases e, portanto, só será capaz de se ligar na caspase-11 quando esta enzima estiver na forma ativa. Após 17 h de infecção, o lisado celular foi submetido ao ensaio de *pull-down* de caspase-11 usando partículas esféricas de agarose conjugadas à estreptavidina, as quais se ligam ao inibidor através da biotina. Feito o *pull-down*, as amostras foram submetidas à técnica de Western Blotting usando o anticorpo primário anti-caspase-11. A caspase-11 só será observada no

blotting dos tratamentos nos quais a caspase-11 foi ativada. Como controle, amostras do lisado inicial antes do ensaio de *pull-down (input)* foram incubadas com anticorpos primários para caspase-11 e para a proteína constitutiva β -actina.

A partir do resultado do Western Blotting, foi possível observar a presença de caspase-11 ativa somente em BMDMs selvagens infectadas com *B. abortus* (Fig. 11D). Em BMDMs deficientes nos GBP^{chr3} , bem como em BMDMs não infectados não foi possível observar presença de caspase-11 ativa. Quando as amostras de lisado controle (*input*) foram incubadas com anticorpo anti-caspase-11, observamos que houve expressão de caspase-11 tanto em BMDMs selvagens quanto *Gbp^{chr3-/-}* infectadas com *B. abortus*. Ao passo que, BMDMs não infectadas nem primadas não foram capazes de expressar caspase-11. Além disso, observamos que todos os tratamentos possuíam o mesmo número de células a partir dos níveis iguais de expressão de β -actina em todas as amostras.

Coletivamente, esses dados sugerem que os GBPs do cromossomo 3 são fundamentais para a ativação de caspase-11 e consequente formação de poro em macrófagos em resposta a *B. abortus*.

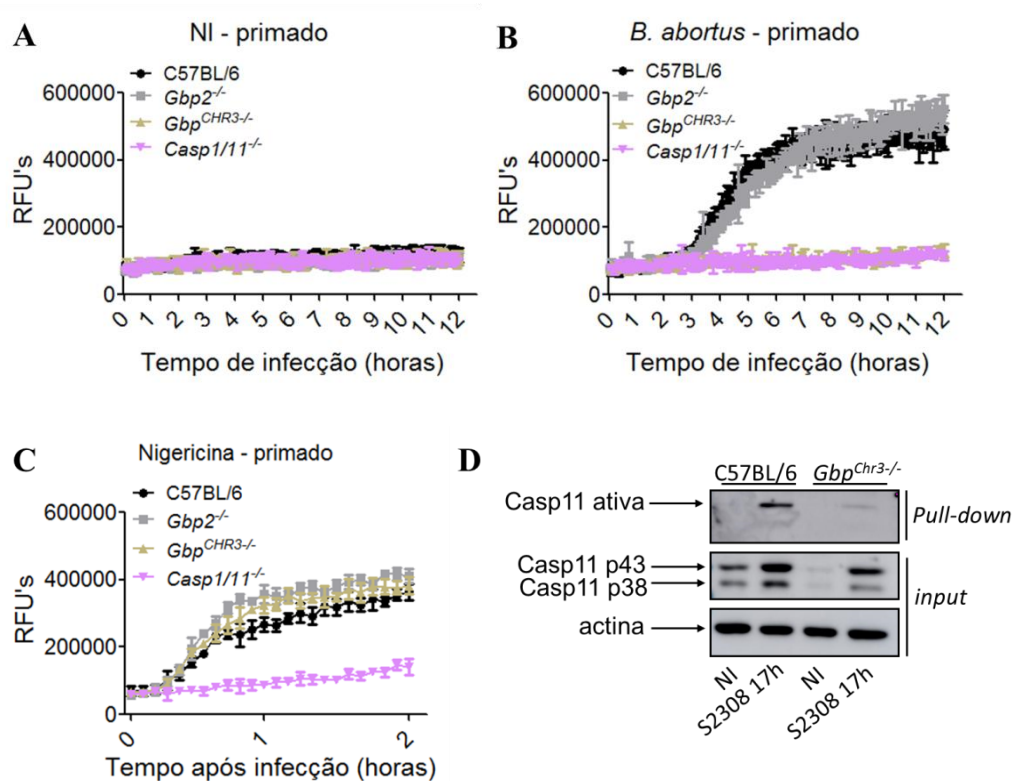


Figura 11: A piroptose e a ativação de caspase-11 em resposta a *B. abortus* são dependentes dos GBPs do cromossomo 3. (A-C) BMDMs das linhagens C57BL/6, *Gbp2*^{-/-}, *Gbp*^{chr3}^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} foram mantidas (A) não infectadas (NI) ou (B) estimuladas com *B. abortus* com MOI 100 ou (C) tratadas com nigericina (20 μM). A formação de poros foi quantificada fluorimetricamente em tempo real pelo influxo de iodoeto de propídeo (unidades relativas de fluorescência – RFUs). (D) BMDMs das linhagens C57BL/6 e *Gbp*^{chr3}^{-/-} foram pré-tratadas com o inibidor de caspases marcado com biotina (Biotin-VAD-FMK) e após 15 min infectadas com *B. abortus* com MOI 100. Após 17 h de infecção, o lisado celular foi preparado e submetido ao ensaio de *pull-down* de caspase-11 usando partículas esféricas de agarose conjugadas à estreptavidina. A amostra obtida (*Pull-down*) foi submetida à técnica de Western Blotting utilizando anticorpo específico para caspase-11. O *input* foi incubado com anticorpo primário anti-caspase-11 ou com o anticorpo primário anti-β-actina. NI: não infectado; RFU: unidades relativas de fluorescência. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes.

Nossos dados sugerem que o LPS de *B. abortus* é o PAMP responsável por ativar a via não-canônica. Estudos anteriores sugerem que caspase-11 atua como um receptor intracelular de LPS (Shi et al., 2014). No entanto, um estudo recente demonstrou que os GBPs têm uma função notável mediando a interação do LPS com caspase-11 (Santos et al., 2018). Por isso, nos perguntamos se as GBPs possuem papel na ativação do inflamassoma não-canônico de caspase-11 também em resposta ao LPS de *B. abortus* purificado. Para isso, BMDMs das linhagens C57BL/6, *Gbp2*^{-/-} e *Gbp*^{chr3}^{-/-} pré-

estimuladas com PAM3CSK foram transfectadas com LPS de *B. abortus* usando o reagente de transfecção FuGENE[®]HD e o influxo de iodeto de propídio foi avaliado durante 8 h de infecção. Observamos que BMDMs das linhagens C57BL/6 e *Gbp2*^{-/-} formaram poros em resposta ao LPS de *B. abortus*, enquanto BMDMs deficientes nos GBPs do cromossomo 3 foram incapazes de formar poros em resposta ao LPS bacteriano (Fig. 12A-C). Além disso, investigamos se os GBP^{chr3} também eram importantes para a ativação da caspase-11 em resposta ao LPS de *B. abortus*. BMDMs das linhagens C57BL/6 e *Gbp*^{chr3}^{-/-} foram previamente estimulados com PAM3CSK durante 6 h. Em seguida, essas células foram pré-tratadas com um inibidor de caspases marcado com biotina (Biotina-VAD-FMK) e após 15 min, foi realizada a transfecção com o LPS de *B. abortus*. Após 17 h, os lisados das células foram submetidos ao ensaio de *pull-down* com partículas esféricas de agarose acopladas à estreptavidina. Para observar os níveis de ativação da caspase-11, as amostras de lisado foram submetidas à técnica de Western Blotting utilizando anticorpo específico anti-caspase-11. Assim como observado previamente quando infectamos os macrófagos com a bactéria inteira, observamos aqui que os macrófagos C57BL/6 foram capazes de ativar a caspase-11 em resposta ao LPS purificado de *B. abortus*, enquanto que BMDMs deficientes nos GBPs do cromossomo 3 foram incapazes de ativar caspase.11 (Fig. 12D).

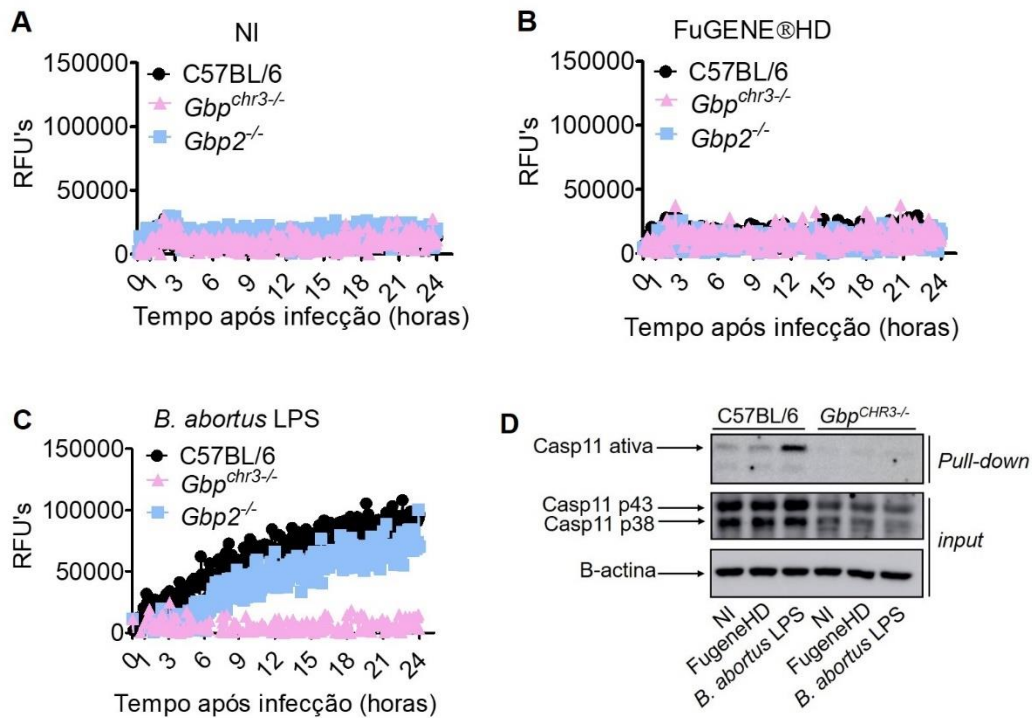


Figura 12: O LPS de *B. abortus* ativa caspase-11 e desencadeia a piroptose de maneira dependente de proteínas ligadoras de guanilato (GBPs). BMDMs C57BL/6, *Gbp2^{-/-}* e *Gbp^{chr3}-/-* pré-tratados com PAM3CSK (500 ng/ml) por 6 h permaneceram não transfectados (NI) (A), foram tratados com FuGENE®HD (B) ou tratados com o LPS de *B. abortus* (5 µg/ml) pré-misturado com FuGENE®HD (C) de acordo com as instruções do fabricante. A formação de poros foi avaliada fluorimetricamente em tempo real pela incorporação de iodeto de propídio (unidades relativas de fluorescência). (D) Os BMDMs foram pré-tratados com o inibidor de caspases biotilado biotin-VAD-FMK 15 min antes da transfecção. As células foram transfectadas com o LPS de *B. abortus* utilizando o reagente de transfecção FuGENE®HD durante 17 h. O imunoblotting mostra a presença das subunidades p43 e p38 de caspase-11 no lisado celular total (input) e na fração do *pull-down* utilizando a fração agarose-estreptavidina dos BMDMs. A β-actina foi usada como controle da quantidade de proteína aplicada. NI: não transfectado; RFU: unidade relativa de fluorescência; C: controle; Fug: tratado com FuGENE®HD; *B. abortus* LPS: transfectado com LPS de *B.a.*. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes.

Dada essa importância dos GBPs na ativação de caspase-11 e formação de poro em resposta ao LPS de *B. abortus*, decidimos investigar quais dos GBPs estariam envolvidos na ativação da via não canônica em resposta ao LPS de *B. abortus*. Em primeiro lugar, realizamos análises da expressão de GBP1, GBP2, GBP3, GBP4, GBP5 e GBP7 por qPCR em macrófagos transfectados com o LPS de *Brucella*. A partir desse experimento, observamos um aumento na expressão do mRNA de GBP2, GBP3, GBP4, GBP5 e, em menor extensão, GBP7, em resposta à transfecção com o LPS bacteriano em comparação com células transfectadas somente com o reagente de transfecção

FuGENE[®]HD (Fig 13A). Vale notar que o GBP4 não está presente no cromossomo 3, mas sim no cromossomo 5, porém é o que apresentou maior aumento na expressão do mRNA quando os macrófagos foram transfectados com o LPS de *B. abortus*. Já no caso do GBP1, observamos que não houve aumento de sua expressão em resposta ao LPS de *B. abortus*. Em seguida, BMDMs da linhagem selvagem C57BL/6 foram silenciados com siRNA correspondente aos genes de GBP1, GBP3, GBP4, GBP5 e GBP7 (Fig. 13B), transfectados com LPS de *B. abortus* e em seguida, avaliada a secreção de IL-1 β e liberação de LDH. Como mostrado nas Fig 14 A e C, células tratadas com siRNA para GBP4 e GBP5, foram capazes de reduzir a secreção de IL-1 β e a liberação de LDH em comparação com outros GBPs silenciados. Vale notar que embora o GBP4 tenha apresentado maiores níveis de expressão do mRNA em resposta ao LPS de *B. abortus*, células silenciadas em GBP5 foram as que apresentaram maior redução nos níveis de secreção de IL-1 β e liberação de LDH em resposta ao LPS de *B. abortus*. Simultaneamente, também realizamos experimentos semelhantes com macrófagos deficientes em GBP2 e nos GBPs do cromossomo 3. Esses experimentos demonstraram que GBP2 não desempenha nenhum papel na secreção de IL-1 β e liberação de LDH em resposta ao reconhecimento do LPS de *Brucella* por caspase-11 (Fig 14B e D). Coletivamente, esses dados sugerem que os GBPs, mais especificamente o GBP4 e o GBP5, medeiam a ativação da caspase-11 e conseqüentemente desencadeiam a ativação do inflamassoma não-canônico em resposta ao LPS de *B. abortus* purificado.

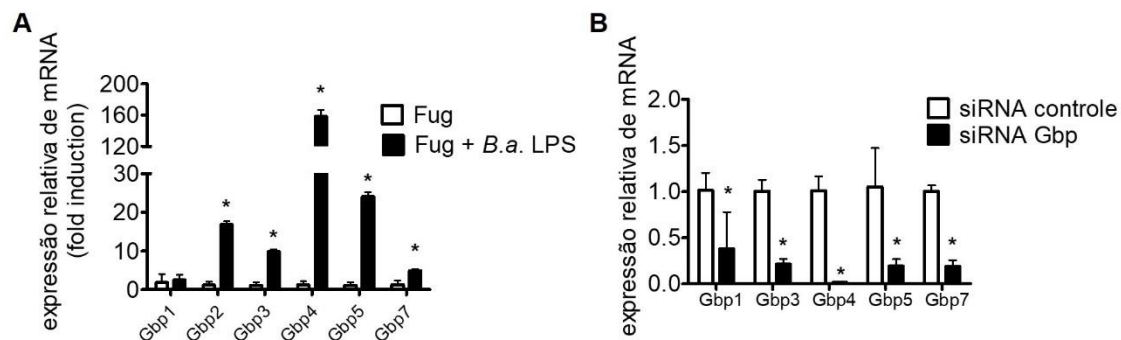


Figura 13: Expressão de proteínas ligadoras de guanilato (GBPs) em BMDMs. (A) BMDMs de camundongos C57BL/6 foram transfectados com o LPS (5 µg/ml) de *B. abortus* usando o reagente de transfecção FuGENE®HD. Após 17 h de transfecção, o RNA foi extraído, purificado e a qPCR foi realizada para medir os níveis de expressão de GBP1, GBP2, GBP3, GBP4, GBP5 e GBP7. * p < 0,05 quando comparado ao FuGENE®HD sozinho. (B) BMDMs de camundongos C57BL/6 foram transfectados com siRNAs da siGENOME SMARTpools (Dharmacon) para os siRNAs controle, GBP1, GBP3, GBP4, GBP5 ou GBP7 por 46 h e então transfectados com o LPS (5 µg/ml) de *B. abortus*. Após 17 h, o RNA total foi extraído, purificado e qPCR realizado para medir os níveis de expressão de GBP1, GBP3, GBP4, GBP5 e GBP7. * p < 0,05 quando comparado ao siRNA controle.

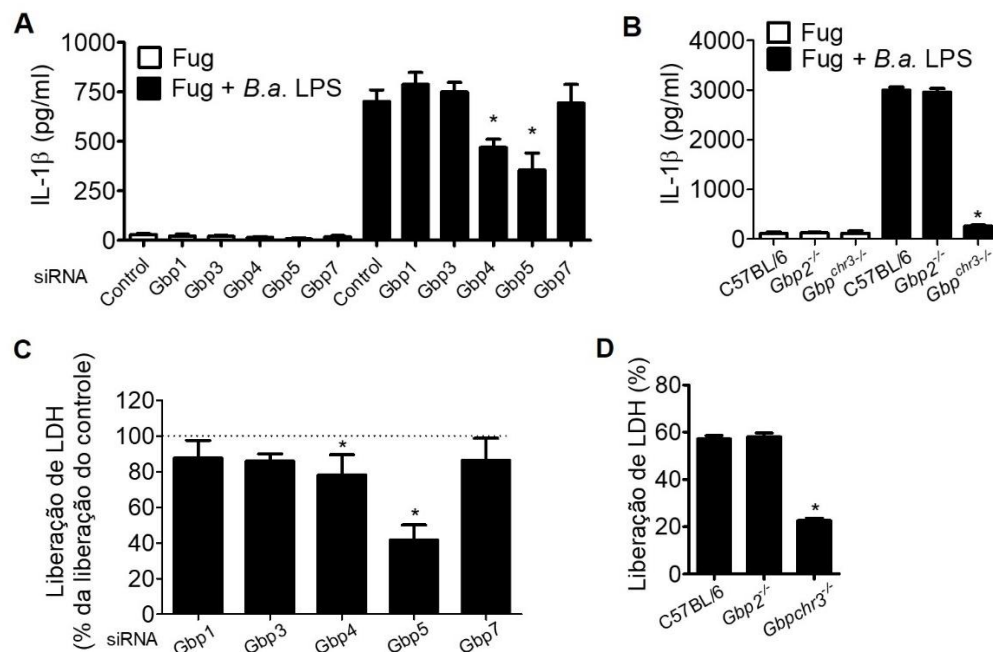


Figura 14: GBP4 e GBP5 são requeridas para secreção de IL-1β e liberação de LDH em resposta ao LPS de *B. abortus*. BMDMs de camundongos C57BL/6 pré-tratados com PAM3CSK (500 ng/ml) foram transfectados com siRNA para GBP1, 3, 4, 5 e 7 por 46 h. Macrófagos tratados com siRNA ou obtidos de camundongos *Gbp2*^{-/-} ou *Gbp^{chr3}*^{-/-} foram transfectados com FuGENE®HD sozinho ou com o LPS de *B. abortus* (5 µg/ml) pré-misturado com FuGENE®HD de acordo com as instruções do fabricante. Após 17 h, os sobrenadantes foram coletados. (A-B) A secreção de IL-1β foi medida por ELISA. * p < 0,05 comparado ao siRNA controle ou C57BL/6. A piroptose foi avaliada medindo a liberação de LDH no sobrenadante. (C) Para BMDMs que tiveram os GBPs silenciados, os valores representam a porcentagem do valor médio de liberação de LDH em comparação com células transfectadas com siRNA controle que foi utilizado como um valor de referência definido para 100%. * p < 0,05 em comparação com cada célula tratada com siRNA de GBP transfectada com o LPS de *B. abortus*. (D) Para BMDMs silenciados nos GBPs, os valores representam a porcentagem de LDH liberada em comparação com as células lisadas com Triton X-100. * p < 0,05 em comparação com culturas de células C57BL/6 transfectadas com o LPS de *B. abortus*. Os dados mostram a média ± desvio padrão representativa de dois experimentos independentes.

5.5 – Gasdermina-D é fundamental para induzir a piroptose e ativar o inflamassoma de NLRP3 em resposta a *B. abortus*

Recentemente, a identificação de uma proteína denominada Gasdermina-D (GSDMD) contribuiu para a elucidação do mecanismo de formação de poros envolvidos na piroptose (Aglietti et al., 2016; He et al., 2015; Kayagaki et al., 2015; Liu et al., 2016; Sborgi et al., 2016; Shi et al., 2015). A GSDMD atua como substrato de caspase-11 e, uma vez clivada, o fragmento N-terminal é recrutado para a membrana celular levando à formação de poros na membrana. Como observamos que *B. abortus* é capaz de desencadear a piroptose em macrófagos, decidimos avaliar o requerimento de GSDMD para formação de poros em resposta a *B. abortus*. Primeiramente, macrófagos obtidos de animais C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} permaneceram não infectados ou foram infectados com *B. abortus* para a avaliação do papel de GSDMD na formação de poros em resposta a essa bactéria. A partir da quantificação do influxo de iodeto de propídeo em tempo real durante 8 h de infecção, descobrimos que BMDMs de camundongos C57BL/6, formaram poros, enquanto que BMDMs de camundongos *Gsdmd*^{-/-}, *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} não formaram poros em resposta a *B. abortus* (Fig. 15B). Como esperado, as células não infectadas foram incapazes de formar poros (Fig. 15A). Isto sugere uma importância de GSDMD para a formação de poros em resposta a *B. abortus*. Uma vez que ocorre a formação do poro, a pressão osmótica leva à indução de influxo de água, levando ao inchaço e conseqüente ruptura das membranas, liberando o conteúdo citosólico como a enzima lactato desidrogenase (LDH). Dessa forma, a fim de avaliar o papel de GSDMD durante a piroptose induzida por *B. abortus*, foi quantificada a liberação de LDH em sobrenadantes de cultura celular. Os BMDMs obtidos de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} foram infectados com *B. abortus* e após 8 h de infecção a LDH foi quantificada nos sobrenadantes. Observamos

que *B. abortus* desencadeou maior porcentagem de liberação de LDH em macrófagos C57BL/6 em comparação com macrófagos das linhagens *Gsdmd*^{-/-}, *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} (Fig 15C). Estes dados dão suporte aos resultados do ensaio de formação de poros, sugerindo que GSDMD e caspase-11 são essenciais à piroptose em resposta a *B. abortus*. A caspase-11 ativa cliva GSDMD para separar a subunidade reguladora p20 da subunidade citotóxica p30, que se oligomeriza na membrana celular lipídica formando um poro que culmina no evento de piroptose. Como observamos que *B. abortus* é capaz de desencadear a piroptose dependente de GSDMD, decidimos avaliar se caspase-11 é capaz de clivar GSDMD em resposta à infecção por *B. abortus*. Para isso, infectamos BMDMs de camundongos das linhagens C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} com *B. abortus* e após 17 h, o sobrenadante foi coletado e submetido à técnica de Western Blotting. Observamos que BMDMs C57BL/6 e *Nlrp3*^{-/-} foram totalmente capazes de clivar GSDMD em sua subunidade p30 ativa (Fig. 15D). No entanto, em macrófagos *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} a clivagem da GSDMD foi abolida. Como esperado, macrófagos *Gsdmd*^{-/-} não expressaram a proteína GSDMD. Dessa forma, este resultado indica que caspase-11 é fundamental para a clivagem de GSDMD em resposta a *B. abortus*. Além disso, NLRP3 foi dispensável para a clivagem de GSDMD. Em seguida, investigamos o papel de GSDMD na secreção de IL-1 β e ativação de caspase-1. BMDMs de camundongos das linhagens C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} foram infectados com *B. abortus* por 17 h. A secreção de IL-1 β e a ativação de caspase-1 foram avaliadas no sobrenadante dessas células. Observamos que BMDMs deficientes em GSDMD se assemelharam a BMDMs *Casp11*^{-/-}, apresentando níveis reduzidos de secreção de IL-1 β e ativação de caspase-1 em comparação com os macrófagos C57BL/6 (16A e 16B). Como esperado, BMDMs *Casp1/11*^{-/-} não secretaram IL-1 β ou expressaram caspase-1. Como indicado na literatura, pelos poros de gasdermina-D que se formam na

membrana, há um efluxo de íons, como o potássio, bem como secreção limitada de pequenas proteínas citosólicas que se encaixam nesses poros, como a própria IL-1 β (Gaidt and Hornung, 2016). Apesar da grande variedade de estímulos que desencadeiam a ativação de NLRP3 (por exemplo, espécies reativas de oxigênio, liberação de DNA mitocondrial oxidado, catepsinas lisossomais e RNA bacteriano) o efluxo de potássio parece ser um ponto de convergência essencial para a ativação do inflamassoma NLRP3 (Baker et al., 2015; Munoz-Planillo et al., 2013; Perregaux and Gabel, 1994; Petrilli et al., 2007; Ruhl and Broz, 2015; Schmid-Burgk et al., 2015). Portanto, decidimos investigar a necessidade do efluxo de potássio para a ativação de NLRP3 em resposta a *B. abortus*. Submetemos os BMDMs de camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} a um meio contendo alta concentração de K⁺ e após 1 h, as células foram infectadas com *B. abortus*. Após 17 h, a secreção de IL-1 β no sobrenadante foi avaliada. Observamos uma redução significativa na secreção de IL-1 β em BMDMs C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} quando as células foram incubadas em meio contendo K⁺ elevado (Fig. 16C). Como esperado, a IL-1 β não foi processada em BMDMs de camundongos *Casp1/11*^{-/-}. O aumento da concentração de K⁺ extracelular preveniu a ativação do inflamassoma de NLRP3, sugerindo uma grande importância do efluxo de potássio para a ativação do inflamassoma em resposta a *B. abortus*. Em seguida, avaliamos se GSDMD e caspase-11 eram necessárias para o efluxo de potássio em resposta a *B. abortus*. Observamos que a concentração de potássio intracelular diminuiu em BMDMs C57BL/6 em resposta à infecção por *B. abortus* enquanto que em macrófagos *Casp11*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} as concentrações de potássio permaneceram em níveis semelhantes aos observados nos controles não infectados (Fig. 16D).

Em resumo, esses dados sugerem que a piroptose, dependente de caspase-11 e GSDMD é central para o efluxo de potássio e, conseqüentemente, para a ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta a *B. abortus*.

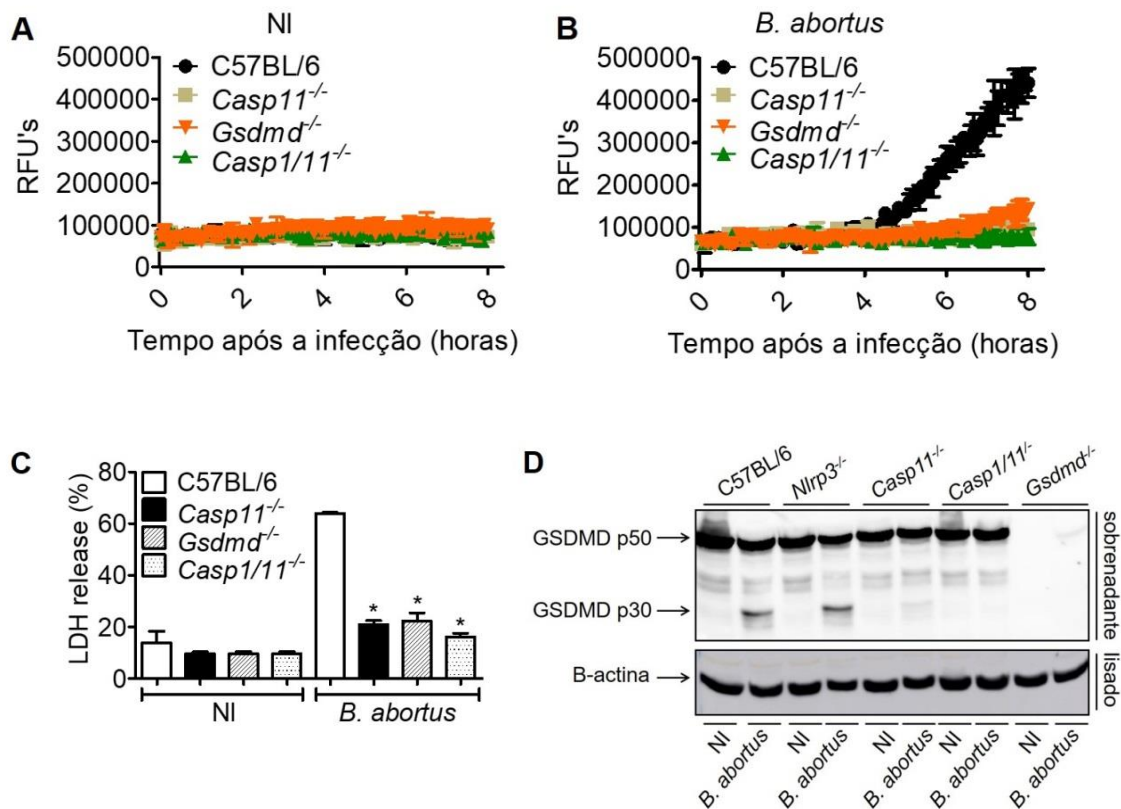


Figura 15: A Gasdermina-D (GSDMD) é requerida para induzir o processo de piroptose em resposta à infecção por *B. abortus*. BMDMs obtidos de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} permaneceram não infectados (NI) ou foram estimulados com *B. abortus*. BMDMs pré-estimulados com LPS de *E. coli* (1 µg/ml) por 4 h permaneceram não infectados (A) ou foram infectados com *B. abortus* (B) em um MOI de 100. A formação de poros foi avaliada fluorimetricamente em tempo real pela absorção de iodeto de propídio (unidades relativas de fluorescência) no núcleo dos BMDMs permeabilizados. (C) BMDMs primados permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados com *B. abortus* em um MOI de 100 por 8 h e, após esse tempo, foi quantificada a liberação de LDH no sobrenadante celular. Os valores representam a porcentagem de LDH liberada em comparação com as células controle lisadas com Triton X-100. *p<0,05 em comparação com culturas C57BL/6 infectadas com *B. abortus*. (D) Imunoblotting mostrando GSDMD p50 e p30 nos lisados de BMDMs primados obtidos de camundongos C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp11*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} infectados com *B. abortus* em um MOI de 100 por 8 h. A β-actina foi quantificada nos lisados celulares correspondentes como controle da quantidade de proteína aplicada. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes. NI: não infectado; RFU: unidade relativas de fluorescência.

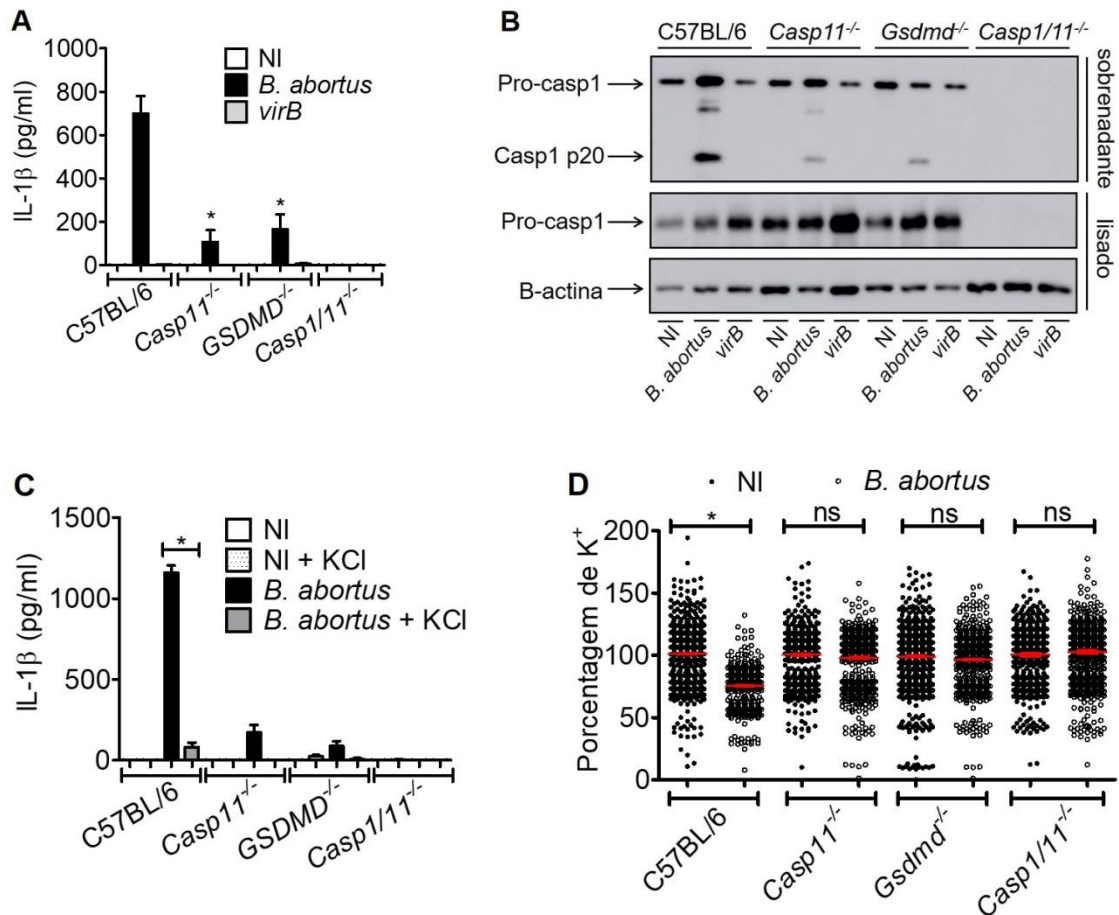


Figura 16: Caspase-11 e Gasdermina-D (GSDMD) são importantes para o efluxo de K⁺ e ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta a *B. abortus*. (A) Os BMDMs permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados com *B. abortus* ou mutantes *virB2* a um MOI de 100 durante 17 h de infecção. Os sobrenadantes foram submetidos ao ELISA para estimar a concentração de IL-1β. (B) Os mesmos sobrenadantes e lisados de cultura coletados 17 h pós-infecção foram separados por SDS-PAGE, transferidos e marcados com anticorpo monoclonal anti-caspase-1 p20. A β-actina foi quantificada nos lisados celulares correspondentes como controle da quantidade de proteína aplicada. (C) Os BMDMs obtidos de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} foram incubados em um meio contendo 80 mM de KCl 1 h antes da infecção. Após isso, BMDMs foram infectados com *B. abortus* em um MOI de 100 no mesmo meio por 17 h. A IL-1β no sobrenadante foi medida utilizando kits de ELISA para IL-1β de camundongo. As diferenças estatisticamente significativas entre BMDMs tratados com KCl versus não tratados foi denotada por um asterisco para p<0,05. (D) A avaliação dos níveis intracelulares de K⁺ foi realizada utilizando a sonda fluorescente de K⁺ APG-2. Os BMDMs obtidos de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados por 6 h com *B. abortus* em um MOI de 100. Cada ponto representa a porcentagem de intensidade de fluorescência do APG-2 em relação à fluorescência média das células controle, e as barras vermelhas representam a média de todas as células analisadas. As diferenças estatisticamente significativas entre BMDMs infectados versus NI foi denotada por *p<0,05. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes. NI: não infectado; *virB*: mutante *B. abortus*. ns: estatisticamente não significativo.

5.6 – GSDMD e caspase-11 são essenciais para o controle da infecção por *B. abortus* e regulam o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas

Uma vez que os BMDMs deficientes em caspase-11 apresentaram redução na ativação de caspase-1 e na secreção dos níveis de IL-1 β , avaliamos se caspase-11 e caspase-1 também desempenham um papel na restrição da infecção por *Brucella* em camundongos. Em primeiro lugar, camundongos das linhagens C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-} *Casp11*^{Tg}, *Casp1/1*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} foram infectados de maneira intraperitoneal com *B. abortus*. Após 2 semanas de infecção, as unidades formadoras de colônias (UFCs) bacterianas foram determinadas a partir do homogenato do baço. Os animais *Casp1*^{-/-} *Casp11*^{Tg} e *Nlrp3*^{-/-} foram tão resistentes à infecção quanto os camundongos C57BL/6 (Fig. 17A). Em contraste, as cargas bacterianas foram aproximadamente 1 log mais altas nos camundongos *Casp11*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} em comparação aos animais C57BL/6. Além disso, quantificamos a replicação intracelular de *Brucella* em macrófagos dessas mesmas linhagens C57BL/6, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp1*^{-/-} *Casp11*^{Tg} e *Casp11*^{-/-}. Os BMDMs foram infectados com *B. abortus* e o crescimento bacteriano foi avaliado após 24, 48 e 72 h de infecção. Observamos uma multiplicação robusta dessa bactéria em todas essas linhagens de macrófagos de 0 a 72 h de infecção (Fig. 17B). Entretanto, em nenhum dos tempos foi possível observar diferença significativa na susceptibilidade entre as linhagens analisadas. Coletivamente, esses dados sugerem que caspase-11, mas não caspase-1 está envolvida na resposta a *B. abortus in vivo*, mas não em macrófagos *in vitro*.

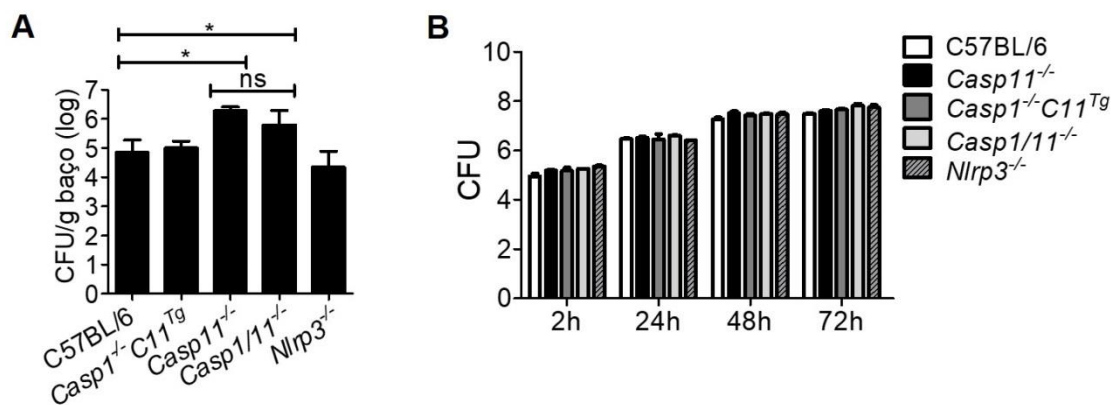


Figura 17: A caspase-11, mas não caspase-1 e NLRP3, é requerida para o controle da infecção de *B. abortus* em camundongos, mas não em macrófagos. (A) Camundongos das linhagens C57BL/6, Casp11^{-/-}, Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}, Nlrp3^{-/-} e Casp1/11^{-/-} foram infectados de forma intraperitoneal com 1x10⁶ UFC de *B. abortus*. Os camundongos foram sacrificados 2 semanas após a infecção e os homogenatos de baço diluídos foram plaqueados em placas de ágar contendo meio BB para determinação do CFU. Os dados mostrados são a média ± desvio padrão de cinco camundongos/grupo. As diferenças estatisticamente significativas de Casp11^{-/-} e Casp1/11^{-/-} em comparação com camundongos do tipo selvagem são denotadas por um asterisco, *p <0,05. O gráfico é representativo de três experimentos independentes. (B) BMDMs das linhagens C57BL/6, Nlrp3^{-/-}, Casp1/11^{-/-}, Casp1^{-/-} C11^{Tg} e Casp11^{-/-} foram infectados com *B. abortus* com MOI 100 e centrifugadas para permitir a fagocitose bacteriana eficiente pelas BMDMs. As culturas foram incubadas por 24, 48, e 72 h para determinação de CFU. São mostradas as médias ± desvio padrão dos poços em triplicata.

A piroptose desencadeada por GSDMD foi recentemente associada ao *clearance* bacteriano, uma vez que pelos poros formados nos macrófagos ocorre a liberação de mediadores inflamatórios que contribuem para o recrutamento de células como os neutrófilos, contribuindo para o controle da infecção (Jorgensen et al., 2016a; Jorgensen et al., 2016b). Nesse trabalho, observamos que GSDMD e caspase-11 participam do processo de piroptose em resposta à infecção por *B. abortus*. Além disso, observamos que caspase-11 é importante para o controle da infecção de *B. abortus* em camundongos. Portanto, investigamos o papel de GSDMD no controle da infecção por *B. abortus*. Para isso, foram infectados camundongos das linhagens C57BL/6, Gsdmd^{-/-} e Casp11^{-/-} de forma intraperitoneal com *B. abortus* e após 72 h, 1 e 2 semanas, os animais foram sacrificados, o baço foi retirado, macerado e o homogenato foi plaqueado em meio *Brucella* Broth (BB) sólido para crescimento e posterior quantificação do número de

UFCs. Foi observado um maior crescimento bacteriano nos camundongos *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} em comparação com os animais C57BL/6 após 1 e 2 semanas de infecção (Fig. 18A). No entanto, após 72 h de infecção com *B. abortus*, nenhuma diferença na contagem bacteriana foi observada, sugerindo que a ausência de GSDMD e caspase-11 não afetou a colonização inicial bacteriana por *B. abortus* nesses animais. Além disso, quantificamos a replicação intracelular de *Brucella* em macrófagos das linhagens C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} após 2, 24 e 48 h após a infecção *in vitro*. Nenhuma diferença no número de UFCs intracelulares foi detectada entre os macrófagos das linhagens de camundongos testadas (Fig. 18B). Estes achados sugerem um papel de caspase-11 e GSDMD após 1 e 2 semanas de infecção em camundongos, porém não em macrófagos *in vitro*.

Coletivamente, estes resultados demonstram que GSDMD e caspase-11, mas não caspase-1, são importantes para o controle da replicação de *B. abortus* em camundongos.

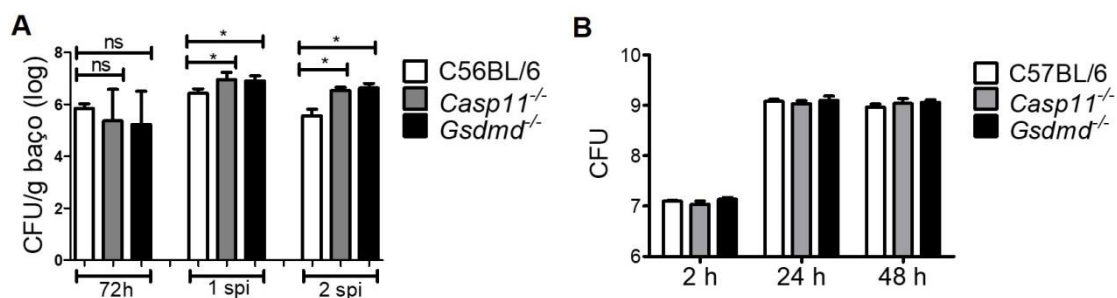


Figura 18: Caspase-11 e GSDMD são requeridas para o controle da infecção *in vivo*, mas são dispensáveis para a restrição da replicação de *B. abortus* em macrófagos. (A) Camundongos das linhagens C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^6 UFC de *B. abortus*. Os camundongos foram sacrificados após 72 h, 1 e 2 semanas de infecção, e os homogenatos de baço diluídos foram plaqueados em placas contendo meio ágar BB para determinação de CFU. Os dados mostrados são a média \pm desvio padrão de cinco camundongos/grupo. * $p < 0,05$, comparado a camundongos do tipo selvagem. (B) BMDMs obtidos de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} foram infectados com *B. abortus* em um MOI de 100 por poço. As culturas foram incubadas por 2, 24 e 48 h para determinação de CFU. São mostradas as médias \pm desvio padrão dos poços em triplicata.

Neste trabalho, nós observamos que macrófagos deficientes em caspase-11 bem como os deficientes em caspase-1/caspase-11, produzem quantidades reduzidas de IL-1 α .

Dessa forma, decidimos avaliar se os níveis reduzidos de IL-1 α em células deficientes em caspase-11 estavam relacionados à maior susceptibilidade de animais deficientes em caspase-11 *in vivo*. Para tanto, infectamos camundongos selvagens e IL-1 α ^{-/-} por via intraperitoneal. Após 2 semanas de infecção, os animais foram sacrificados, o baço foi retirado, macerado e o homogenato foi plaqueado em meio *Brucella* Broth (BB) sólido para crescimento e posterior quantificação do número de CFUs (Fig. 19). Observamos que os animais deficientes em IL-1 α se mostraram tão susceptíveis à infecção quanto os animais selvagens, dessa forma, sugerindo que embora a secreção de IL-1 α dependa de caspase-11, essa citocina não se relaciona com o controle da infecção *in vivo* em resposta a *B. abortus*.

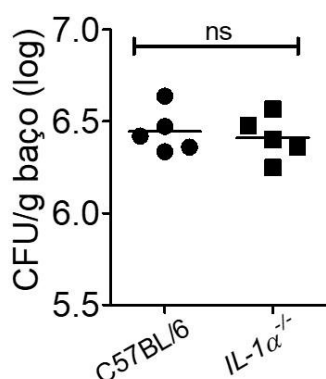


Figura 19: Camundongos deficientes em IL-1 α não mostraram aumento da carga bacteriana após a infecção por *B. abortus* quando comparados a animais do tipo selvagem. Camundongos C57BL/6 e IL-1 α ^{-/-} foram infectados por via intraperitoneal com 1x10⁶ UFC de *B. abortus*. Os camundongos foram sacrificados 2 semanas após a infecção e os homogenatos de baço diluídos foram plaqueados em placas de ágar contendo meio BB para determinação de UFC. Os dados são a média \pm desvio padrão de cinco camundongos/grupo. O gráfico é representativo de dois experimentos independentes. ns: estatisticamente não significativo.

Como observamos que os camundongos *Gsdmd*^{-/-} são mais suscetíveis à infecção e que GSDMD está envolvida na piroptose em resposta a *B. abortus*, decidimos investigar o mecanismo envolvido na suscetibilidade de camundongos deficientes em GSDMD. Para isso, avaliamos se os camundongos deficientes em GSDMD e caspase-11

apresentavam uma deficiência no recrutamento de populações de células imunes para o baço. Os animais das linhagens C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} foram infectados com *B. abortus* e após 2 semanas, eles foram sacrificados, seu baço foi extraído e foram analisados os números de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas no baço por citometria de fluxo. Observamos um maior número de neutrófilos, células dendríticas e macrófagos no baço de camundongos C57BL/6 infectados com *B. abortus* em comparação com camundongos não infectados (Fig. 20A-20C). No entanto, quando analisamos essas populações de células no baço de camundongos *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} infectados com *B. abortus*, observamos uma redução no número de neutrófilos, células dendríticas e macrófagos em comparação com camundongos C57BL/6. Adicionalmente, submetemos os homogenatos esplênicos de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} infectados com *B. abortus* a um ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO) e dosagem da quimiocina KC para confirmar se camundongos deficientes em GSDMD e Casp11 apresentavam menor recrutamento de neutrófilos no baço. Observou-se atividade reduzida de MPO (Fig 20D) e diminuição dos níveis de KC (Fig. 21) nos homogenatos esplênicos dos animais *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} infectados com *B. abortus* em comparação com homogenatos de camundongos C57BL/6. A fim de confirmar essa deficiência no recrutamento de neutrófilos, realizamos a análise de microscopia confocal *ex vivo* do baço de camundongos após 72 h de infecção por *B. abortus*. Claramente, observamos um influxo reduzido de neutrófilos nos baços marcados com anticorpo anti-Ly6G dos animais *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} quando comparados com animais do tipo selvagem (Fig 20E). Estes achados suportam a hipótese de que GSDMD e caspase-11 desempenham um papel no recrutamento de neutrófilos em resposta a *B. abortus*. Para determinar se esses neutrófilos estavam ativados, nós medimos os níveis de expressão de CD62L na superfície de células Ly6G⁺ encontrados no baço de camundongos *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} por citometria de

fluxo. A CD62L é uma L-selectina marcadora da ativação de neutrófilos. A regulação negativa da expressão de CD62L na superfície dos neutrófilos é característica de ativação celular (Neufert et al., 2001). A partir das análises, observamos que os níveis de CD62L nas células Ly6G⁺ foram maiores nos animais infectados com *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} em comparação com os animais C57BL/6, o que sugere neutrófilos menos ativados (Fig. 20F). Adicionalmente, quantificamos o número de células Ly6G⁺ expressando IL-17 em baços de camundongos. Duas semanas após a infecção com *B. abortus*, os animais *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} mostraram uma produção reduzida de IL-17 dentro da população de células Ly6G⁺ em comparação com os animais C57BL/6 (Fig. 22). Para determinar o papel dos neutrófilos no controle da infecção por *Brucella*, tratamos os camundongos selvagens C57BL/6 com anticorpo anti-Ly6G por uma semana. Como controle, tratamos os animais selvagens com anticorpo controle de isotipo. A depleção de neutrófilos em animais do tipo selvagem infectados com *Brucella* tornou os camundongos mais suscetíveis à replicação bacteriana *in vivo* em comparação com animais que receberam tratamento com o anticorpo controle de isotipo (Fig 23A-23B). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que caspase-11 e GSDMD desempenham um papel na restrição da infecção por *B. abortus* em camundongos e medeiam o recrutamento e ativação de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas.

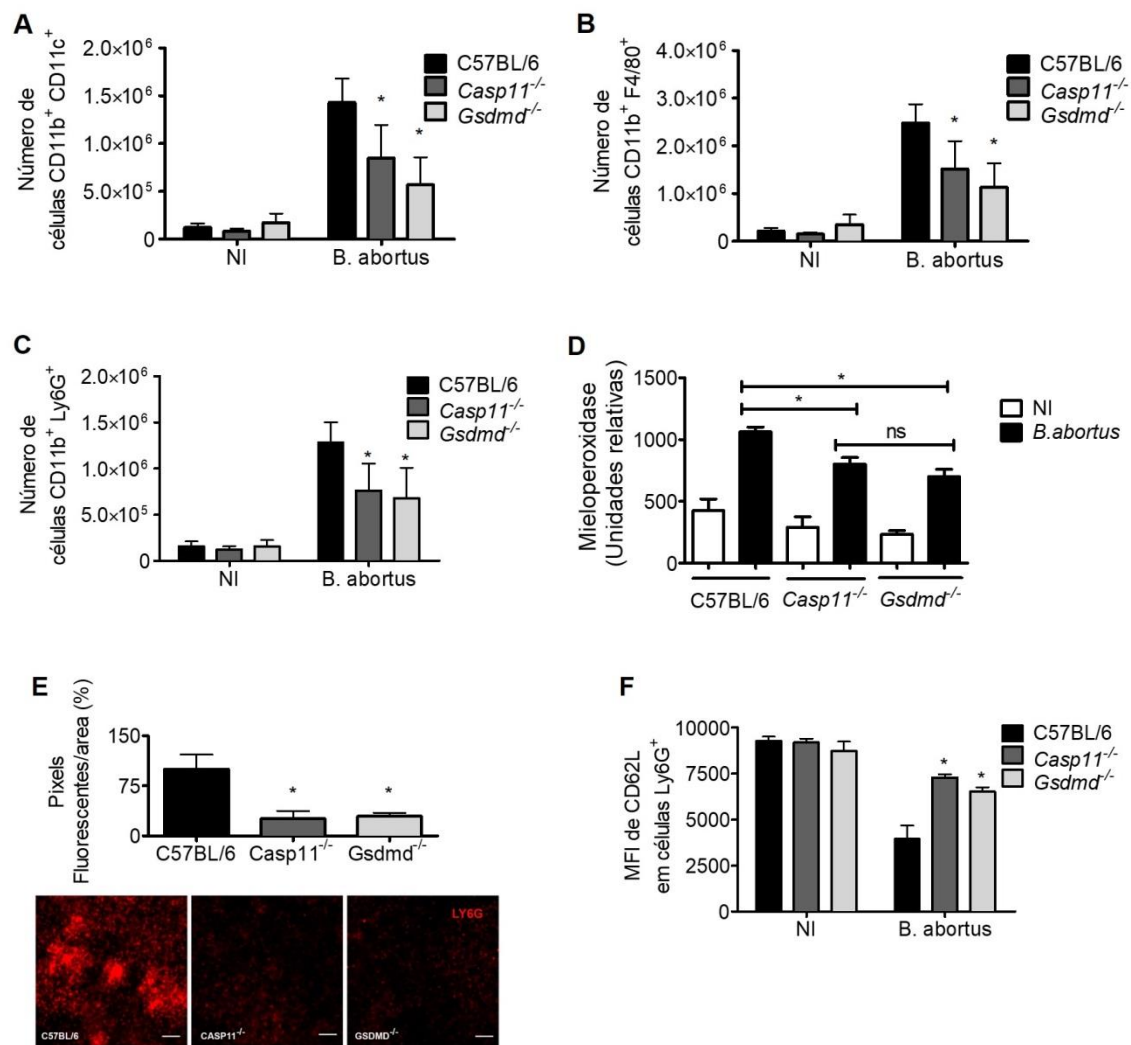


Figura 20: A GSDMD regula o recrutamento de células imunes inatas. (A-C) Células de baço de camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} infectados foram marcadas *ex-vivo* para análise por citometria de fluxo. As células foram avaliadas para CD11b⁺ CD11c⁺ (A), CD11b⁺ F4/80⁺ (B) e CD11b⁺ Ly6G⁺ (C). Os dados mostram a média ± desvio padrão de cinco camundongos/grupo. (D) Os homogenatos esplênicos de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} infectados com *B. abortus* foram submetidos ao ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO). Os dados são média ± desvio padrão de cinco camundongos/grupo. (E) Camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} foram infectados com *B. abortus*, e 3 dias pós-infecção foram inoculados i.v. com o anticorpo anti-Ly-6G PE. Imagens representativas mostram imagens confocais *ex-vivo* de órgãos inteiros de baços de cada grupo. A porcentagem de pixels fluorescentes vermelhos por área de órgão também é mostrada. Barra de escala = 100 μm. (F) Análise do MFI (mediana da intensidade de fluorescência) de CD62L em populações de células Ly6G⁺ de camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-}, quando estimuladas com *B. abortus* ou meio isolado (NI). * p < 0,05, comparado a camundongos do tipo selvagem. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes. DCs: células dendríticas; ns: estatisticamente não significativo; NI: não infectado.

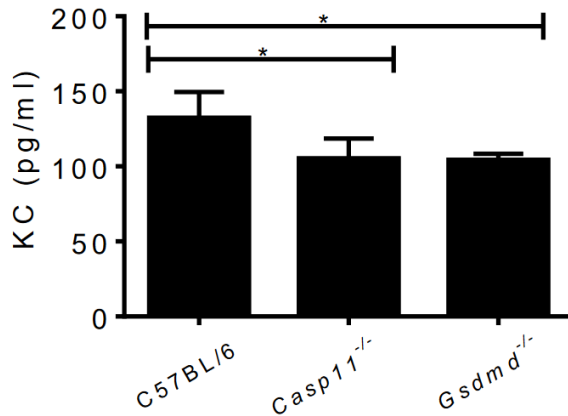


Figura 21: Produção de KC em resposta à infecção por *B. abortus* em baço de camundongos. Camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} foram infectados de forma intraperitoneal com 1x10⁶ UFC de *B. abortus*. Os camundongos foram sacrificados 2 semanas após a infecção e os baços foram coletados e processados para extração da citocina. A concentração de KC nos homogenatos de baço foi medida por ELISA. Os dados mostram a média ± desvio padrão de cinco camundongos/grupo. *p<0,05 em comparação com camundongos do tipo selvagem.

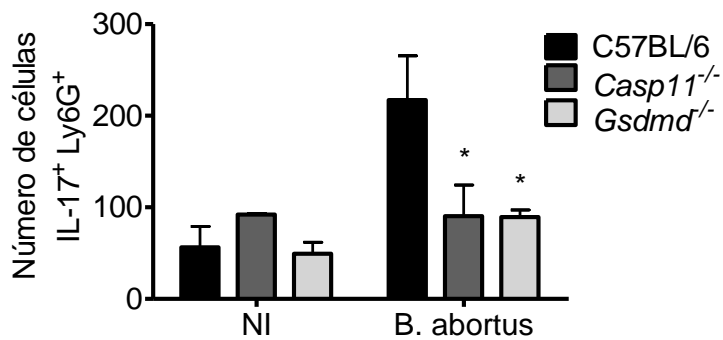


Figura 22: Expressão de IL-17 em células Ly6G⁺ de baço de camundongos infectados por *B. abortus*. Camundongos C57BL/6, *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} foram infectados de forma intraperitoneal com 1x10⁶ UFC de *B. abortus*. Os camundongos foram sacrificados 2 semanas após a infecção, os baços foram coletados e foram isolados os esplenócitos. O número de células Ly6G⁺ expressando IL-17 em 1x10⁶ esplenócitos foi determinado por citometria de fluxo. * p < 0,05, comparado a camundongos do tipo selvagem.

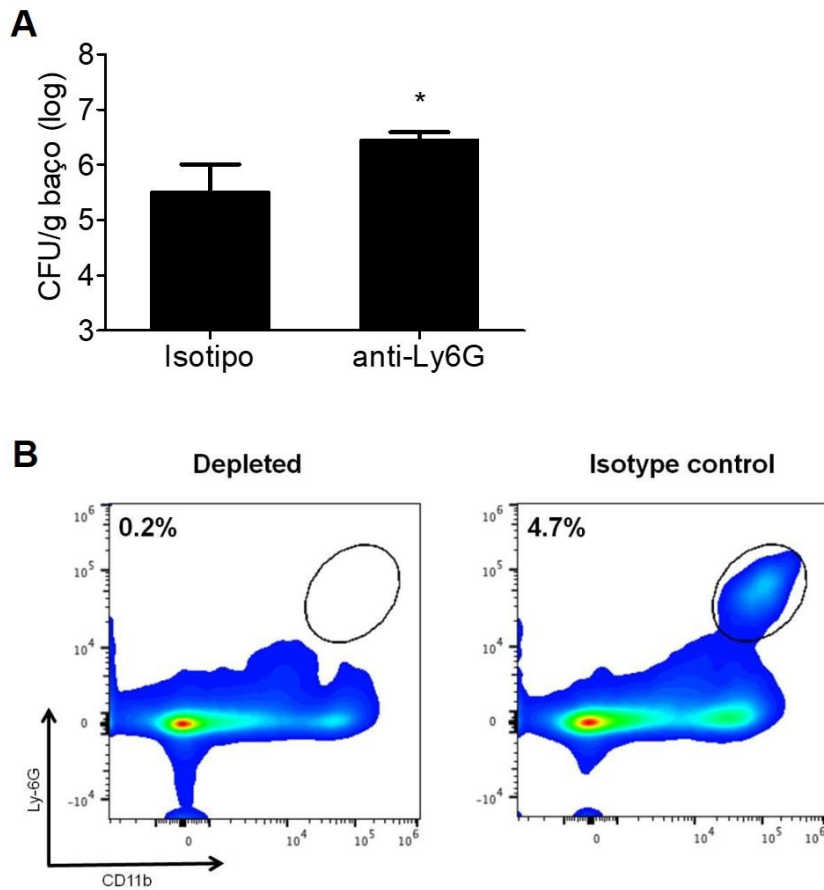


Figura 23: Camundongos selvagens tratados com anti-Ly6G são mais suscetíveis à infecção por *B. abortus*. (A) Análise de UFC de *Brucella* em camundongos depletados em neutrófilos. Antes e durante a infecção, os camundongos foram tratados com anticorpo controle de isotipo ou com anticorpo anti-Ly6G. Os baços foram retirados no dia 7 pós-infecção e a carga bacteriana foi avaliada. * $p < 0,05$, comparado a camundongos do tipo selvagem. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes. (B) Camundongos WT receberam anticorpo para depleção anti-Ly6G (100 mg/animal) a cada 2 dias durante sete dias. A depleção de neutrófilos no baço foi medida por citometria de fluxo. $n = 5$ por grupo por experimento. Os gráficos de FACS são representativos de 2 experimentos independentes.

6 – Discussão

O LPS de bactérias Gram-negativas é o principal componente da membrana externa bacteriana e é crucial para o reconhecimento de bactérias por células imunes (Rosenfeld and Shai, 2006). Em algumas bactérias Gram-negativas, o LPS é reconhecido pelo receptor TLR4, leva à indução de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Kawai et al., 1999) e atua como grande indutor de choque séptico (Rosenfeld and Shai, 2006). No entanto, bactérias patogênicas desenvolveram estratégias para escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico que possibilitam o estabelecimento de uma infecção no hospedeiro. Uma dessas estratégias é a modificação de seu LPS, dessa forma, evitando o reconhecimento efetivo pelo receptor TLR4 (Steimle et al., 2016). Dentre as bactérias Gram-negativas, *B. abortus* é um exemplo de bactéria que possui modificações em seu LPS. O LPS dessa bactéria possui ácidos graxos de cadeia longa, o que contribui para um baixo poder imunoestimulatório, sendo essa característica importante como fator de virulência na tentativa de evasão do sistema imune (Moreno et al., 1981; Moreno et al., 1984; Rasool et al., 1992). Nesse contexto, a molécula de caspase-11 surge como uma segunda barreira para o reconhecimento de LPS, atuando como um receptor intracelular para promover a vigilância citoplasmática (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2013; Shi et al., 2014). Uma vez ativada, leva à piroptose e ativação do inflamassoma de NLRP3 e consequente ativação de caspase-1 e liberação de citocinas pró-inflamatórias, sendo fundamental para a imunidade inata contra bactérias Gram-negativas (Aachoui et al., 2013; Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2011; Kayagaki et al., 2013). Portanto, neste estudo, investigamos se a *B. abortus* era capaz de ativar este inflamassoma não-canônico de caspase-11. Aqui, demonstramos que caspase-11 é importante para a ativação de caspase-1 e secreção de citocinas como IL-1 β e IL-1 α em resposta a *B. abortus*. Nós também avaliamos se o LPS da *B. abortus* atua como o PAMP

responsável pela ativação do inflamassoma não-canônico. Observamos que o LPS da *B. abortus* purificado é suficiente para conduzir a ativação do inflamassoma não-canônico de caspase-11. Embora o LPS da *B. abortus* escape da vigilância da superfície celular por TLR4, ele não escapa do controle citoplasmático da caspase-11. Esses achados são distintos do observado para outras bactérias, como *Francisella novicida*, a qual modifica seu LPS e escapa à vigilância imunológica tanto por TLR4 quanto por caspase-11 (Hagar et al., 2013). Assim, a via de caspase-11 parece ser importante para controlar a infecção por *B. abortus*. O reconhecimento do LPS por caspase-11 ocorre quando esta molécula é hexa-acilada (Kayagaki et al., 2013). O LPS de *B. abortus* possui ácidos graxos de cadeia longa, no entanto, hexa-acilados (Tsolis et al., 2008). Além disso, já foi relatado que a bactéria *L. pneumophila*, cujo LPS também é hexa-acilado com ácidos graxos de cadeia longa, é capaz de ativar o inflamassoma não-canônico (Case et al., 2013), da mesma forma que observamos aqui para a *B. abortus*. Embora tenhamos utilizado neste estudo macrófagos pré-estimulados com o LPS de *E. coli* para demonstrar a ativação de caspase-11 e a piroptose induzida por *B. abortus*, células não-primadas também mostraram fenótipo similar. No entanto, uma vez que essas células são primadas antes do momento da infecção, as proteínas do inflamassoma são altamente expressas, as células são sincronizadas e ficam prontas para responder a um segundo sinal, induzindo níveis mais altos de formação de poros e ativação de caspase-11 em comparação com células não primadas. Em relação aos macrófagos transfectados com LPS de *Brucella*, foi necessário o estímulo prévio com PAM3CSK para ativar a via de caspase-11/piroptose. Este fato faz sentido, uma vez que durante a infecção por *Brucella*, outros PAMPs como as lipoproteínas, podem fornecer o primeiro sinal para ativar a célula e, quando o LPS bacteriano é liberado no citoplasma, a caspase-11 já está pronta para reconhecê-lo.

Pilla e colaboradores sugeriram que os GBPs do cromossomo 3 de camundongos possivelmente agem em colaboração com caspase-11 no reconhecimento do LPS da *L. pneumophila* que possui diferenças estruturais na porção do lipídeo A (Pilla et al., 2014). Além disso, Santos e colaboradores, confirmaram que as proteínas GBP^{chr3} facilitam a interação do LPS com caspase-11 (Santos et al., 2018). Além disso, estudos prévios incluindo um de nosso grupo demonstraram que os GBPs podem se associar com vacúolos contendo patógenos, contribuindo para sua lise e resultando na liberação de PAMPs bacterianos no citoplasma (Costa Franco et al., 2018; Meunier et al., 2014). Aqui observamos que as proteínas GBPs do cromossomo 3 são necessárias para a ativação de caspase-11 e piroptose na infecção de macrófagos com *B. abortus* ou transfectados com o seu LPS purificado. Assim, nossos dados suportam a ideia de que os GBPs contribuem para a lise do BCV, como previamente demonstrado pelo nosso grupo, mas essas moléculas também podem contribuir para o reconhecimento do LPS bacteriano por caspase-11. Além disso, Santos e colaboradores demonstraram que o papel das proteínas GBP^{chr3} mediando a interação do LPS com a caspase-11 é principalmente observado quando o LPS é incorporado em membranas lipossômicas (Santos et al., 2018). De fato, aqui usamos o reagente FuGENE[®]HD nas transfecções, o qual incorpora o LPS em vesículas lipossômicas que mimetiza as membranas contendo LPS. Além disso, a fim de determinar qual dos GBPs de camundongos estaria envolvido na detecção do LPS da *Brucella* por caspase-11, nós silenciámos os GBP1, GBP3, GBP4, GBP5, GBP7 utilizando siRNA em macrófagos C57BL/6 e usamos células deficientes em GBP2. Vale ressaltar que embora o GBP4 não esteja contido no cromossomo 3, mas sim no cromossomo 5, optamos por silenciá-lo, uma vez que ele foi o que apresentou maior aumento na expressão de mRNA quando BMDMs foram transfectados com o LPS de *B. abortus*. E de fato, a falta da expressão de GBP4 e GBP5, mas não de outros GBPs,

resultou na redução da secreção de IL-1 β e redução na liberação de LDH em macrófagos transfectados com o LPS de *Brucella*. Estas descobertas sugerem que os GBP4 e GBP5 possuem papel colaborativo no reconhecimento do LPS de *Brucella* por caspase-11. De fato, Pilla e colaboradores (2014) já haviam sugerido um papel colaborativo entre as GBPs na via não canônica em resposta a *Legionella* (Pilla et al., 2014). Além disso, mais recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou que o miR-21a-5p levou à redução da expressão de GBP5 em macrófagos infectados com *Brucella* e aumentou a carga bacteriana nessas células (Corsetti et al., 2018). Este estudo destaca a importância da regulação de GBP5 por um miRNA na suscetibilidade de macrófagos à infecção por *Brucella*.

Nos últimos anos, grande progresso na compreensão do mecanismo envolvido na piroptose foi alcançado. Estudos demonstraram que uma vez que a caspase-11 é ativada, ela cliva GSDMD em dois domínios: um domínio p20 C-terminal e um domínio p30 N-terminal capaz de oligomerizar e se inserir na membrana formando um poro (Gaidt and Hornung, 2016; He et al., 2015; Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015). Como a água pode entrar nas células através destes poros, um desequilíbrio osmótico é criado levando à morte celular (Gaidt and Hornung, 2016). No caso da *Brucella*, relatos anteriores estabeleceram que *Brucella* lisa virulenta inibe a morte celular de macrófagos, enquanto a cepa rugosa atenuada induz a apoptose via ativação de caspase-2 (Chen et al., 2011; Chen and He, 2009; Pei et al., 2014; Pei et al., 2008). Em contraste, outro estudo observou que *B. melitensis* lisa induziu apoptose em linhagens de macrófagos Raw264.7 via produção de ROS (Li et al., 2016). Adicionalmente, vários estudos observaram que a cepa lisa 2308 da *B. abortus* induziu a morte celular apoptótica em células dendríticas, astrócitos e linfócitos T (Garcia Samartino et al., 2010; Li and He, 2012; Velasquez et al., 2012). Em nosso estudo, observamos a formação de poros e confirmamos a morte celular

utilizando o ensaio de liberação de LDH, sugerindo que *B. abortus* desencadeia a piroptose dependente de caspase-11/GSDMD. Aqui, nós infectamos BMDMs com *B. abortus* opsonizada a fim de aumentar a fagocitose e sincronizar a infecção, um protocolo diferente do utilizado por outros pesquisadores que trabalham com a bactéria *Brucella*. Essa estratégia é a que melhor mimetiza a infecção *in vivo* e tem sido amplamente utilizada em outros estudos envolvendo outros patógenos e piroptose (Cerqueira et al., 2015; Cunha et al., 2015; Cunha et al., 2017; Marim et al., 2010; Mascarenhas et al., 2017). Assim, pode ser utilizada para explicar essas discrepâncias observadas em nosso estudo em comparação com relatos anteriores. Mais recentemente, Lacey e colaboradores estudando o papel dos inflamassomas na artrite induzida por *Brucella* concluiu que a cepa da *Brucella* lisa induz a piroptose em macrófagos via caspase-1/caspase-11, confirmando nossos resultados (Lacey et al., 2018). Além disso, o processo de piroptose também parece estar fortemente relacionado à restrição da infecção *in vivo*. Observou-se que camundongos deficientes em caspase-11 e GSDMD que estão envolvidos na piroptose são mais susceptíveis a infecção por *Brucella* em comparação com animais de tipo selvagem, sugerindo que *B. abortus* desencadeia piroptose e este evento é importante para controlar a infecção. Recentemente, outros trabalhos relataram que a piroptose leva à secreção de moléculas, como IL-1 β , IL-1 α e eicosanóides, os quais recrutam neutrófilos para o local da infecção, promovendo a fagocitose das células infectadas e contribuindo com a restrição da infecção (Jorgensen et al., 2016a; Jorgensen et al., 2016b). De fato, aqui observamos menor recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas no baço de camundongos *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} infectados com *B. abortus*. Nossa hipótese é que esse recrutamento celular e a deficiência de ativação poderiam ser um dos mecanismos para explicar o aumento da carga bacteriana observada em camundongos *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} em resposta a essa bactéria. Para confirmar isso, depletamos

neutrófilos de animais selvagens infectados e nossos resultados demonstraram que a depleção de neutrófilos aumentou a suscetibilidade de camundongos à infecção por *Brucella*. Portanto, especulamos que a piroptose dependente de caspase-11/GSDMD contribui para o recrutamento e ativação de células imunes em resposta a *B. abortus* e este processo pode promover o controle de infecção em camundongos, embora a validação formal ainda seja necessária. Além disso, em um estudo anterior do nosso grupo, demonstramos que a falta de IL-1R torna os camundongos mais suscetíveis à infecção por *Brucella* (Gomes et al., 2013). Assim, a secreção reduzida de IL-1 β em camundongos *Casp11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} é outro mecanismo possível que contribui para o aumento da suscetibilidade à infecção. A liberação de IL-1 α também tem sido relacionada ao recrutamento de neutrófilos e controle de infecção em resposta a outras bactérias, como *L. pneumophila* (Casson et al., 2013). No entanto, embora tenhamos observado que BMDMs *Casp11*^{-/-} liberaram níveis reduzidos de IL-1 α , os camundongos deficientes em IL-1 α não mostraram aumento da carga bacteriana após 2 semanas de infecção quando comparados aos animais selvagens em resposta a *B. abortus*. Dessa forma, a citocina IL-1 α não parece estar ligada ao controle de infecção em resposta a *B. abortus*. Em resumo, a suscetibilidade dos animais deficientes em caspase-11 e GSDMD à infecção por *Brucella* é desencadeada por uma resposta inflamatória multifacetada contra essa infecção bacteriana.

No geral, nossos resultados levam a um modelo no qual *B. abortus* é fagocitada por macrófagos e estabelece seu BCV (vacúolo contendo *Brucella*) para se replicar. As proteínas GBPs, principalmente GBP4 e GBP5, contribuem para o reconhecimento do LPS de *B. abortus* por caspase-11, levando à ativação celular. Uma vez ativada, a caspase-11 cliva GSDMD em suas formas p20 e p30. A subunidade p30 de GSDMD promove a piroptose levando ao efluxo de K⁺ que contribui para a ativação do inflamassoma de

NLRP3 desencadeando a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β . Além disso, o processo de piroptose possivelmente contribui para a secreção de moléculas pró-inflamatórias que desencadeiam o recrutamento e a ativação dos neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, que participam na restrição da infecção por *B. abortus* em camundongos (Fig. 24).

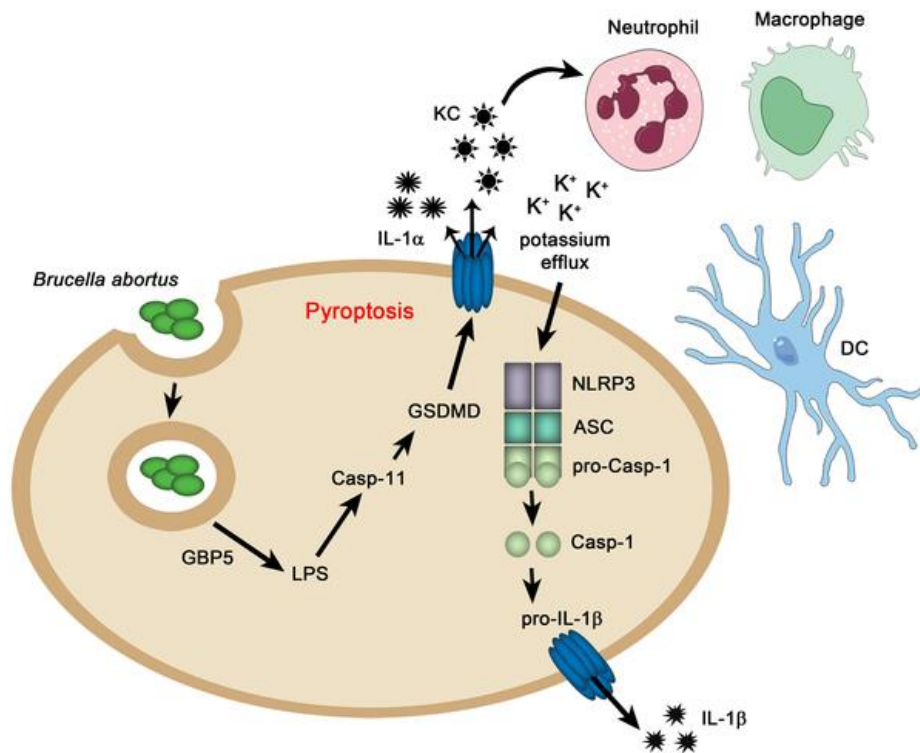


Figura 24: Modelo esquemático proposto para ativação do inflamassoma não-canônico em resposta à infecção por *B. abortus*. *B. abortus* fagocitada secreta proteínas efetoras no citosol dos macrófagos e estabelece o seu BCV (vacúolo contendo *Brucella*). O reconhecimento do LPS de *B. abortus* pela caspase-11 ocorre com a participação das proteínas GBP4 e GBP5. A caspase-11 ativa cliva GSDMD em suas formas p20 e p30. Uma vez clivada, a subunidade p30 de GSDMD desencadeia piroptose que promove o efluxo de K⁺ contribuindo para a ativação do inflamassoma de NLRP3. Essa ativação do inflamassoma culmina na ativação da caspase-1 e na secreção de IL-1 β . Além disso, a piroptose induzida por GSDMD libera outras citocinas como IL-1 α e KC que podem contribuir para o recrutamento de células imunes como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos que podem participar da restrição da infecção por *B. abortus* em camundongos.

7 – Considerações finais

A brucelose é uma doença que atinge tanto os animais domésticos quanto o homem. Ainda hoje, essa enfermidade causa inúmeros prejuízos na pecuária, além de ser um sério problema de saúde pública. Os dados apresentados nesse trabalho avançam na compreensão dos mecanismos da imunidade inata envolvidos na resposta a esse patógeno. Observamos que embora o LPS de *B. abortus* não seja um forte ativador de TLR4, ele é capaz de desencadear a ativação intracelular de caspase-11 e, conseqüentemente, da via não-canônica do inflamassoma. Observamos que *B. abortus* desencadeia piroptose em macrófagos de forma dependente de GBPs e GSDMD. Além disso, os GBP4 e GBP5 se mostraram importantes no reconhecimento do LPS de *Brucella* por caspase-11 desencadeando a liberação de LDH e secreção de IL-1 β . Por fim, avançamos na compreensão de mecanismos envolvidos no controle da infecção dessa bactéria, visto que observamos que o processo de piroptose dependente de caspase-11/GSDMD desencadeado por *B. abortus* é importante para a restrição da infecção *in vivo*, uma vez que contribui para o recrutamento e ativação de células imunológicas como os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. A partir da depleção de neutrófilos, os dados sugerem uma importância dos neutrófilos para o controle da infecção dessa bactéria. Portanto, as informações obtidas a partir desse trabalho complementam o modelo de ativação da resposta imune inata por *B. abortus* e sugerem possíveis alvos terapêuticos a serem utilizados no combate à infecção desse patógeno.

8 – Referências bibliográficas

- Aachoui, Y., Leaf, I.A., Hagar, J.A., Fontana, M.F., Campos, C.G., Zak, D.E., Tan, M.H., Cotter, P.A., Vance, R.E., Aderem, A., Miao, E.A., 2013. Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. *Science* 339, 975-978.
- Aglietti, R.A., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, M.G., Liu, P.S., Kayagaki, N., Ciferri, C., Dixit, V.M., Dueber, E.C., 2016. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 7858-7863.
- Andrews, N.W., Almeida, P.E., Corrotte, M., 2014. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends in cell biology* 24, 734-742.
- Archambaud, C., Salcedo, S.P., Lelouard, H., Devilard, E., de Bovis, B., Van Rooijen, N., Gorvel, J.P., Malissen, B., 2010. Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *European journal of immunology* 40, 3458-3471.
- Atluri, V.L., Xavier, M.N., de Jong, M.F., den Hartigh, A.B., Tsolis, R.M., 2011. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annual review of microbiology* 65, 523-541.
- Baker, P.J., Boucher, D., Bierschenk, D., Tebartz, C., Whitney, P.G., D'Silva, D.B., Tanzer, M.C., Monteleone, M., Robertson, A.A., Cooper, M.A., Alvarez-Diaz, S., Herold, M.J., Bedoui, S., Schroder, K., Masters, S.L., 2015. NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. *European journal of immunology* 45, 2918-2926.
- Balakrishnan, A., Karki, R., Berwin, B., Yamamoto, M., Kanneganti, T.D., 2018. Guanylate binding proteins facilitate caspase-11-dependent pyroptosis in response to type 3 secretion system-negative *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell death discovery* 4, 3.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology* 183, 787-791.
- Bellaire, B.H., Roop, R.M., 2nd, Cardelli, J.A., 2005. Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infection and immunity* 73, 3702-3713.
- Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P., 2006. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS biology* 4, e423.
- Boschirolì, M.L., Foulongne, V., O'Callaghan, D., 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current opinion in microbiology* 4, 58-64.
- Boschirolì, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., O'Callaghan, D., 2002. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1544-1549.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.
- Broz, P., 2015. Immunology: Caspase target drives pyroptosis. *Nature* 526, 642-643.

- Broz, P., Dixit, V.M., 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature reviews. Immunology* 16, 407-420.
- Broz, P., Newton, K., Lamkanfi, M., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Monack, D.M., 2010. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *The Journal of experimental medicine* 207, 1745-1755.
- 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.
- Bruce, D., 1887. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. *The Practitioner* 39, 161-170.
- Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., Superti-Furga, G., 2009. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nature immunology* 10, 266-272.
- Campos, P.C., Gomes, M.T., Guimaraes, G., Costa Franco, M.M., Marim, F.M., Oliveira, S.C., 2014. *Brucella abortus* DNA is a major bacterial agonist to activate the host innate immune system. *Microbes and infection* 16, 979-984.
- Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J.M., Haeffner-Cavaillon, N., 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and infection* 4, 915-926.
- Case, C.L., Kohler, L.J., Lima, J.B., Strowig, T., de Zoete, M.R., Flavell, R.A., Zamboni, D.S., Roy, C.R., 2013. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1851-1856.
- Casson, C.N., Copenhaver, A.M., Zwack, E.E., Nguyen, H.T., Strowig, T., Javdan, B., Bradley, W.P., Fung, T.C., Flavell, R.A., Brodsky, I.E., Shin, S., 2013. Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. *PLoS pathogens* 9, e1003400.
- Celli, J., 2015. The changing nature of the *Brucella*-containing vacuole. *Cellular microbiology* 17, 951-958.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Gorvel, J.P., 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine* 198, 545-556.
- Celli, J., Salcedo, S.P., Gorvel, J.P., 2005. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1673-1678.
- Cerqueira, D.M., Pereira, M.S., Silva, A.L., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., 2015. Caspase-1 but Not Caspase-11 Is Required for NLRC4-Mediated Pyroptosis and Restriction of Infection by Flagellated *Legionella* Species in Mouse Macrophages and In Vivo. *J Immunol* 195, 2303-2311.
- Chen, F., Ding, X., Ding, Y., Xiang, Z., Li, X., Ghosh, D., Schurig, G.G., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., He, Y., 2011. Proinflammatory caspase-2-mediated macrophage cell death induced by a rough attenuated *Brucella suis* strain. *Infection and immunity* 79, 2460-2469.
- Chen, F., He, Y., 2009. Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*. *PLoS one* 4, e6830.
- Chen, K.W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N.D., von Pein, J.B., Broz, P., Sweet, M.J., Schroder, K., 2018. Noncanonical

inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Science immunology* 3.

- Chu, L.H., Indramohan, M., Ratsimandresy, R.A., Gangopadhyay, A., Morris, E.P., Monack, D.M., Dorfleutner, A., Stehlik, C., 2018. The oxidized phospholipid oxPAPC protects from septic shock by targeting the non-canonical inflammasome in macrophages. *Nature communications* 9, 996.
- Chu, Z.L., Pio, F., Xie, Z., Welsh, K., Krajewska, M., Krajewski, S., Godzik, A., Reed, J.C., 2001. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 9239-9245.
- Coll, R.C., O'Neill, L., Schroder, K., 2016. Questions and controversies in innate immune research: what is the physiological role of NLRP3? *Cell death discovery* 2, 16019.
- Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., Ugalde, R.A., 2001. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cellular microbiology* 3, 159-168.
- Cookson, B.T., Brennan, M.A., 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in microbiology* 9, 113-114.
- Corbel, M.J., 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging infectious diseases* 3, 213-221.
- Corsetti, P.P., de Almeida, L.A., Goncalves, A.N.A., Gomes, M.T.R., Guimaraes, E.S., Marques, J.T., Oliveira, S.C., 2018. miR-181a-5p Regulates TNF-alpha and miR-21a-5p Influences Gualynate-Binding Protein 5 and IL-10 Expression in Macrophages Affecting Host Control of *Brucella abortus* Infection. *Frontiers in immunology* 9, 1331.
- Costa Franco, M.M., Marim, F., Guimaraes, E.S., Assis, N.R.G., Cerqueira, D.M., Alves-Silva, J., Harms, J., Splitter, G., Smith, J., Kanneganti, T.D., de Queiroz, N., Gutman, D., Barber, G.N., Oliveira, S.C., 2018. *Brucella abortus* Triggers a cGAS-Independent STING Pathway To Induce Host Protection That Involves Guanylate-Binding Proteins and Inflammasome Activation. *J Immunol* 200, 607-622.
- Cunha, L.D., Ribeiro, J.M., Fernandes, T.D., Massis, L.M., Khoo, C.A., Moffatt, J.H., Newton, H.J., Roy, C.R., Zamboni, D.S., 2015. Inhibition of inflammasome activation by *Coxiella burnetii* type IV secretion system effector IcaA. *Nature communications* 6, 10205.
- Cunha, L.D., Silva, A.L.N., Ribeiro, J.M., Mascarenhas, D.P.A., Quirino, G.F.S., Santos, L.L., Flavell, R.A., Zamboni, D.S., 2017. AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Cell reports* 20, 794-805.
- De Bolle, X., Crosson, S., Matroule, J.Y., Letesson, J.J., 2015. *Brucella abortus* Cell Cycle and Infection Are Coordinated. *Trends in microbiology* 23, 812-821.
- de Carvalho, R.V.H., Andrade, W.A., Lima-Junior, D.S., Dilucca, M., de Oliveira, C.V., Wang, K., Nogueira, P.M., Rugani, J.N., Soares, R.P., Beverley, S.M., Shao, F., Zamboni, D.S., 2019. *Leishmania* Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Cell reports* 26, 429-437 e425.
- Deghelt, M., Mullier, C., Sternon, J.F., Francis, N., Laloux, G., Dotreppe, D., Van der Henst, C., Jacobs-Wagner, C., Letesson, J.J., De Bolle, X., 2014. G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen *Brucella abortus*. *Nature communications* 5, 4366.

- Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S., Pfeffer, K., 2007. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol* 179, 7729-7740.
- Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A.K., Beer-Hammer, S., Pfeffer, K., 2013. Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 294-299.
- Deka, R.P., Magnusson, U., Grace, D., Lindahl, J., 2018. Bovine brucellosis: prevalence, risk factors, economic cost and control options with particular reference to India- a review. *Infection Ecology & Epidemiology* 8, 1556548.
- Delpino, M.V., Barrionuevo, P., Macedo, G.C., Oliveira, S.C., Genaro, S.D., Scian, R., Miraglia, M.C., Fossati, C.A., Baldi, P.C., Giambartolomei, G.H., 2012. Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to *Brucella abortus* infection requires TLR2/MyD88-dependent TNF- α production. *Journal of leukocyte biology* 91, 285-298.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P., Letesson, J.J., 2001. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular microbiology* 3, 487-497.
- Dostert, C., Guarda, G., Romero, J.F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., Suva, M.L., Stehle, J.C., Kopf, M., Stamenkovic, I., Corradin, G., Tschopp, J., 2009. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS one* 4, e6510.
- Dostert, C., Petrilli, 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.
- Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122-1126.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I.R., 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and infection* 4, 837-851.
- Evavold, C.L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., Kagan, J.C., 2018. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* 48, 35-44 e36.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., Reed, J.C., 2007. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular cell* 25, 713-724.
- Feeley, E.M., Pilla-Moffett, D.M., Zwack, E.E., Piro, A.S., Finethy, R., Kolb, J.P., Martinez, J., Brodsky, I.E., Coers, J., 2017. Galectin-3 directs antimicrobial guanylate binding proteins to vacuoles furnished with bacterial secretion systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E1698-E1706.
- Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., Beer, H.D., 2007. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1 β by keratinocytes. *Current biology : CB* 17, 1140-1145.
- Feng, S., Fox, D., Man, S.M., 2018. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. *Journal of molecular biology* 430, 3068-3080.

- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., Alnemri, E.S., 2007. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell death and differentiation* 14, 1590-1604.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., Alnemri, E.S., 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., Eisenlohr, L., Landel, C.P., Alnemri, E.S., 2010. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nature immunology* 11, 385-393.
- Finethy, R., Jorgensen, I., Haldar, A.K., de Zoete, M.R., Strowig, T., Flavell, R.A., Yamamoto, M., Nagarajan, U.M., Miao, E.A., Coers, J., 2015. Guanylate binding proteins enable rapid activation of canonical and noncanonical inflammasomes in *Chlamydia*-infected macrophages. *Infection and immunity* 83, 4740-4749.
- Franc, K.A., Krecek, R.C., Hasler, B.N., Arenas-Gamboa, A.M., 2018. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC public health* 18, 125.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., Nunez, 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., Munoz-Planillo, R., Nunez, G., 2012. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature immunology* 13, 325-332.
- Franchi, L., Stoolman, J., Kanneganti, T.D., Verma, A., Ramphal, R., Nunez, G., 2007. Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *European journal of immunology* 37, 3030-3039.
- Freigang, S., 2016. The regulation of inflammation by oxidized phospholipids. *European journal of immunology* 46, 1818-1825.
- Gaidt, M.M., Hornung, V., 2016. Pore formation by GSDMD is the effector mechanism of pyroptosis. *The EMBO journal* 35, 2167-2169.
- Garcia Samartino, C., Delpino, M.V., Pott Godoy, C., Di Genaro, M.S., Pasquevich, K.A., Zwerdling, A., Barrionuevo, P., Mathieu, P., Cassataro, J., Pitossi, F., Giambartolomei, G.H., 2010. *Brucella abortus* induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis. *The American journal of pathology* 176, 1323-1338.
- Giambartolomei, G.H., Zwerdling, A., Cassataro, J., Bruno, L., Fossati, C.A., Philipp, M.T., 2004. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol* 173, 4635-4642.
- Gomes, M.T., Campos, P.C., Oliveira, F.S., Corsetti, P.P., Bortoluci, K.R., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., Oliveira, S.C., 2013. Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. *J Immunol* 190, 3629-3638.
- Gomes, M.T., Campos, P.C., Pereira Gde, S., Bartholomeu, D.C., Splitter, G., Oliveira, S.C., 2016. TLR9 is required for MAPK/NF-kappaB activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. *Journal of leukocyte biology* 99, 771-780.

- Gomes, M.T.R., Cerqueira, D.M., Guimaraes, E.S., Campos, P.C., Oliveira, S.C., 2019. Guanylate-binding proteins at the crossroad of noncanonical inflammasome activation during bacterial infections. *Journal of leukocyte biology*.
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., van der Goot, F.G., 2006. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 126, 1135-1145.
- Hagar, J.A., Powell, D.A., Aachoui, Y., Ernst, R.K., Miao, E.A., 2013. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341, 1250-1253.
- Halle, A., Hornung, 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 NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology* 9, 857-865.
- He, W.T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z.H., Zhong, C.Q., Han, J., 2015. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell research* 25, 1285-1298.
- Hlaing, T., Guo, R.F., Dilley, K.A., Loussia, J.M., Morrish, T.A., Shi, M.M., Vincenz, C., Ward, P.A., 2001. Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *The Journal of biological chemistry* 276, 9230-9238.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., Fitzgerald, K.A., 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514-518.
- 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.
- Hsu, L.C., Ali, S.R., McGillivray, S., Tseng, P.H., Mariathasan, S., Humke, E.W., Eckmann, L., Powell, J.J., Nizet, V., Dixit, V.M., Karin, M., 2008. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7803-7808.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., Perez, F., 2014. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* 343, 1247136.
- Jones, J.W., Kayagaki, N., Broz, P., Henry, T., Newton, K., O'Rourke, K., Chan, S., Dong, J., Qu, Y., Roose-Girma, M., Dixit, V.M., Monack, D.M., 2010. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9771-9776.
- Jorgensen, I., Lopez, J.P., Laufer, S.A., Miao, E.A., 2016a. IL-1beta, IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. *European journal of immunology* 46, 2761-2766.
- Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B.A., Miao, E.A., 2016b. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *The Journal of experimental medicine* 213, 2113-2128.
- Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Whitfield, J., Franchi, L., Taraporewala, Z.F., Miller, D., Patton, J.T., Inohara, N., Nunez, G., 2006. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry* 281, 36560-36568.

- Kaparakis-Liaskos, M., Ferrero, R.L., 2015. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature reviews. Immunology* 15, 375-387.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.
- 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.
- 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., Wong, M.T., Stowe, I.B., Ramani, S.R., Gonzalez, L.C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W.P., Muszynski, A., Forsberg, L.S., Carlson, R.W., Dixit, V.M., 2013. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341, 1246-1249.
- Kim, B.H., Chee, J.D., Bradfield, C.J., Park, E.S., Kumar, P., MacMicking, J.D., 2016. Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense. *Nature immunology* 17, 481-489.
- Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Das, R., Tiwari, S., MacMicking, J.D., 2011. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science* 332, 717-721.
- Knodler, L.A., Crowley, S.M., Sham, H.P., Yang, H., Wrande, M., Ma, C., Ernst, R.K., Steele-Mortimer, O., Celli, J., Vallance, B.A., 2014. Noncanonical inflammasome activation of caspase-4/caspase-11 mediates epithelial defenses against enteric bacterial pathogens. *Cell host & microbe* 16, 249-256.
- Kravets, E., Degrandi, D., Ma, Q., Peulen, T.O., Klumpers, V., Felekyan, S., Kuhnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A., Pfeffer, K., 2016. Guanylate binding proteins directly attack *Toxoplasma gondii* via supramolecular complexes. *eLife* 5.
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., Flavell, R.A., 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000-2003.
- Lacey, C.A., Mitchell, W.J., Dadelahi, A.S., Skyberg, J.A., 2018. Caspases-1 and caspase-11 mediate pyroptosis, inflammation, and control of *Brucella* joint infection. *Infection and immunity*.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2009. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunological reviews* 227, 95-105.
- Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyon, I., Howard, J.C., Gorvel, J.P., 2006. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cellular microbiology* 8, 401-413.
- Lee, B.L., Stowe, I.B., Gupta, A., Kornfeld, O.S., Roose-Girma, M., Anderson, K., Warming, S., Zhang, J., Lee, W.P., Kayagaki, N., 2018. Caspase-11 auto-proteolysis

is crucial for noncanonical inflammasome activation. *The Journal of experimental medicine* 215, 2279-2288.

- Li, T., Xu, Y., Liu, L., Huang, M., Wang, Z., Tong, Z., Zhang, H., Guo, F., Chen, C., 2016. *Brucella Melitensis* 16M Regulates the Effect of AIR Domain on Inflammatory Factors, Autophagy, and Apoptosis in Mouse Macrophage through the ROS Signaling Pathway. *PloS one* 11, e0167486.
- Li, X., He, Y., 2012. Caspase-2-dependent dendritic cell death, maturation, and priming of T cells in response to *Brucella abortus* infection. *PloS one* 7, e43512.
- Lin, X.Y., Choi, M.S., Porter, A.G., 2000. Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *The Journal of biological chemistry* 275, 39920-39926.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V.G., Wu, H., Lieberman, J., 2016. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535, 153-158.
- Macedo, G.C., Magnani, D.M., Carvalho, N.B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R.T., Oliveira, S.C., 2008. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J Immunol* 180, 1080-1087.
- Man, S.M., Karki, R., Malireddi, R.K., Neale, G., Vogel, P., Yamamoto, M., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., 2015. The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by *Francisella* infection. *Nature immunology* 16, 467-475.
- Man, S.M., Karki, R., Sasai, M., Place, D.E., Kesavardhana, S., Temirov, J., Frase, S., Zhu, Q., Malireddi, R.K.S., Kuriakose, T., Peters, J.L., Neale, G., Brown, S.A., Yamamoto, M., Kanneganti, T.D., 2016. IRGB10 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes. *Cell* 167, 382-396 e317.
- Man, S.M., Place, D.E., Kuriakose, T., Kanneganti, T.D., 2017. Interferon-inducible guanylate-binding proteins at the interface of cell-autonomous immunity and inflammasome activation. *Journal of leukocyte biology* 101, 143-150.
- Mariathasan, S., 2007. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes and infection* 9, 664-671.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., Dixit, V.M., 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430, 213-218.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., Dixit, V.M., 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228-232.
- Marim, F.M., Franco, M.M., Gomes, M.T., Miraglia, M.C., Giambartolomei, G.H., Oliveira, S.C., 2017a. The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during *Brucella abortus* infection. *Seminars in immunopathology* 39, 215-223.
- Marim, F.M., Franco, M.M.C., Gomes, M.T.R., Miraglia, M.C., Giambartolomei, G.H., Oliveira, S.C., 2017b. The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during *Brucella abortus* infection. *Seminars in immunopathology* 39, 215-223.
- Marim, F.M., Silveira, T.N., Lima, D.S., Jr., Zamboni, D.S., 2010. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PloS one* 5, e15263.

- 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.
- Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J., 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 27, 229-265.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J., 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241.
- Mascarenhas, D.P.A., Cerqueira, D.M., Pereira, M.S.F., Castanheira, F.V.S., Fernandes, T.D., Manin, G.Z., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., 2017. Inhibition of caspase-1 or gasdermin-D enable caspase-8 activation in the Naip5/NLRC4/ASC inflammasome. *PLoS pathogens* 13, e1006502.
- Meunier, E., Dick, M.S., Dreier, R.F., Schurmann, N., Kenzelmann Broz, D., Warming, S., Roose-Girma, M., Bumann, D., Kayagaki, N., Takeda, K., Yamamoto, M., Broz, P., 2014. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* 509, 366-370.
- Meunier, E., Wallet, P., Dreier, R.F., Costanzo, S., Anton, L., Ruhl, S., Dussurgey, S., Dick, M.S., Kistner, A., Rigard, M., Degrandi, D., Pfeffer, K., Yamamoto, M., Henry, T., Broz, P., 2015. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nature immunology* 16, 476-484.
- Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M., 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442, 39-44.
- Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., Aderem, A., 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature immunology* 7, 569-575.
- Miao, E.A., Ernst, R.K., Dors, M., Mao, D.P., Aderem, A., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2562-2567.
- Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C.G., Warren, S.E., Leaf, I.A., Aderem, A., 2010. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3076-3080.
- Mol, J.P., Costa, E.A., Carvalho, A.F., Sun, Y.H., Tsolis, R.M., Paixao, T.A., Santos, R.L., 2014. Early transcriptional responses of bovine chorioallantoic membrane explants to wild type, DeltavirB2 or DeltatpB *Brucella abortus* infection. *PloS one* 9, e108606.
- Moreno, E., Berman, D.T., Boettcher, L.A., 1981. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and immunity* 31, 362-370.
- Moreno, E., Kurtz, R.S., Berman, D.T., 1984. Induction of immune and adjuvant immunoglobulin G responses in mice by *Brucella* lipopolysaccharide. *Infection and immunity* 46, 74-80.
- Munoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martinez-Colon, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., Nunez, G., 2013. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38, 1142-1153.
- Myeni, S., Child, R., Ng, T.W., Kupko, J.J., 3rd, Wehrly, T.D., Porcella, S.F., Knodler, L.A., Celli, J., 2013. *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS pathogens* 9, e1003556.

- Neufert, C., Pai, R.K., Noss, E.H., Berger, M., Boom, W.H., Harding, C.V., 2001. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J Immunol* 167, 1542-1549.
- Ngo, C.C., Man, S.M., 2017. Mechanisms and functions of guanylate-binding proteins and related interferon-inducible GTPases: Roles in intracellular lysis of pathogens. *Cellular microbiology* 19.
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., Ramuz, M., 1999. A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. *Molecular microbiology* 33, 1210-1220.
- O'Neill, L.A., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 7, 353-364.
- Oliveira, F.S., Carvalho, N.B., Brandao, A.P., Gomes, M.T., de Almeida, L.A., Oliveira, S.C., 2011. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 is essential for initial host control of Brucella abortus infection. *Infection and immunity* 79, 4688-4695.
- Oliveira, F.S., Carvalho, N.B., Zamboni, D.S., Oliveira, S.C., 2012. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and -2 play no role in controlling Brucella abortus infection in mice. *Clinical & developmental immunology* 2012, 861426.
- Olszewski, M.A., Gray, J., Vestal, D.J., 2006. In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 26, 328-352.
- Orning, P., Weng, D., Starheim, K., Ratner, D., Best, Z., Lee, B., Brooks, A., Xia, S., Wu, H., Kelliher, M.A., Berger, S.B., Gough, P.J., Bertin, J., Proulx, M.M., Goguen, J.D., Kayagaki, N., Fitzgerald, K.A., Lien, E., 2018. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science* 362, 1064-1069.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., Zychlinsky, A., 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 191, 677-691.
- Pasquevich, K.A., Garcia Samartino, C., Coria, L.M., Estein, S.M., Zwerdling, A., Ibanez, A.E., Barrionuevo, P., Oliveira, F.S., Carvalho, N.B., Borkowski, J., Oliveira, S.C., Warzecha, H., Giambartolomei, G.H., Cassataro, J., 2010. The protein moiety of Brucella abortus outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J Immunol* 184, 5200-5212.
- Pei, J., Kahl-McDonagh, M., Ficht, T.A., 2014. Brucella dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, 23.
- Pei, J., Wu, Q., Kahl-McDonagh, M., Ficht, T.A., 2008. Cytotoxicity in macrophages infected with rough Brucella mutants is type IV secretion system dependent. *Infection and immunity* 76, 30-37.
- Percin, D., 2013. Microbiology of Brucella. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 8, 13-17.
- 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. *The 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 and differentiation* 14, 1583-1589.
- Pilla, D.M., Hagar, J.A., Haldar, A.K., Mason, A.K., Degrandi, D., Pfeffer, K., Ernst, R.K., Yamamoto, M., Miao, E.A., Coers, J., 2014. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 6046-6051.
- Piro, A.S., Hernandez, D., Luoma, S., Feeley, E.M., Finethy, R., Yirga, A., Frickel, E.M., Lesser, C.F., Coers, J., 2017. Detection of Cytosolic *Shigella flexneri* via a C-Terminal Triple-Arginine Motif of GBP1 Inhibits Actin-Based Motility. *mBio* 8.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., Gorvel, J.P., 1998a. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and immunity* 66, 5711-5724.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L., Gorvel, J.P., 1998b. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infection and immunity* 66, 2387-2392.
- Porte, F., Liautard, J.P., Kohler, S., 1999. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infection and immunity* 67, 4041-4047.
- Qin, Q.M., Pei, J., Ancona, V., Shaw, B.D., Ficht, T.A., de Figueiredo, P., 2008. RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1alpha in supporting *Brucella* replication. *PLoS pathogens* 4, e1000110.
- Rasool, O., Freer, E., Moreno, E., Jarstrand, C., 1992. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infection and immunity* 60, 1699-1702.
- Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S.N., Szomolanyi-Tsuda, E., Fitzgerald, K.A., 2010. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature immunology* 11, 395-402.
- Rathinam, V.A., Vanaja, S.K., Fitzgerald, K.A., 2012a. Regulation of inflammasome signaling. *Nature immunology* 13, 333-342.
- Rathinam, V.A., Vanaja, S.K., Waggoner, L., Sokolovska, A., Becker, C., Stuart, L.M., Leong, J.M., Fitzgerald, K.A., 2012b. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* 150, 606-619.
- Ren, T., Zamboni, D.S., Roy, C.R., Dietrich, W.F., Vance, R.E., 2006. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS pathogens* 2, e18.
- Rittig, M.G., Kaufmann, A., Robins, A., Shaw, B., Sprenger, H., Gemsa, D., Foulongne, V., Rouot, B., Dornand, J., 2003. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *Journal of leukocyte biology* 74, 1045-1055.
- Roberts, T.L., Idris, A., Dunn, J.A., Kelly, G.M., Burnton, C.M., Hodgson, S., Hardy, L.L., Garceau, V., Sweet, M.J., Ross, I.L., Hume, D.A., Stacey, K.J., 2009. HIN-200

proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323, 1057-1060.

- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., Alnemri, E.S., 2017. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications* 8, 14128.
- Rosenfeld, Y., Shai, Y., 2006. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et biophysica acta* 1758, 1513-1522.
- Ruan, J., Xia, S., Liu, X., Lieberman, J., Wu, H., 2018. Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. *Nature* 557, 62-67.
- Ruhl, S., Broz, P., 2015. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. *European journal of immunology* 45, 2927-2936.
- Ruhl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J.C., Broz, P., 2018. ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* 362, 956-960.
- Saeki, N., Kuwahara, Y., Sasaki, H., Satoh, H., Shiroishi, T., 2000. Gasdermin (Gsdm) localizing to mouse Chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 11, 718-724.
- Sangari, F.J., Agüero, J., 1996. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiologia* 12, 207-218.
- Santos, J.C., Dick, M.S., Lagrange, B., Degrandi, D., Pfeffer, K., Yamamoto, M., Meunier, E., Pelczar, P., Henry, T., Broz, P., 2018. LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *The EMBO journal* 37.
- Santos, R.L., Martins, T.M., Borges, A.M., Paixão, T.A., 2013. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33, 759-764.
- Sarhan, J., Liu, B.C., Muendlein, H.I., Li, P., Nilson, R., Tang, A.Y., Rongvaux, A., Bunnell, S.C., Shao, F., Green, D.R., Poltorak, A., 2018. Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, E10888-E10897.
- Sauer, J.D., Witte, C.E., Zemansky, J., Hanson, B., Lauer, P., Portnoy, D.A., 2010. *Listeria monocytogenes* triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. *Cell host & microbe* 7, 412-419.
- Sborgi, L., Ruhl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C.J., Müller, D.J., Broz, P., Hiller, S., 2016. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO journal* 35, 1766-1778.
- Schauvliege, R., Vanrobaeys, J., Schotte, P., Beyaert, R., 2002. Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-gamma requires nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1. *The Journal of biological chemistry* 277, 41624-41630.
- Scheffer, L.L., Sreetama, S.C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K.J., Defour, A., Jaiswal, J.K., 2014. Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications* 5, 5646.
- Schmid-Burgk, J.L., Gaidt, M.M., Schmidt, T., Ebert, T.S., Bartok, E., Hornung, V., 2015. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *European journal of immunology* 45, 2911-2917.

- Shenoy, A.R., Kim, B.H., Choi, H.P., Matsuzawa, T., Tiwari, S., MacMicking, J.D., 2007. Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology* 212, 771-784.
- Shenoy, A.R., Wellington, D.A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C.J., Cresswell, P., MacMicking, J.D., 2012. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* 336, 481-485.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., Shao, F., 2015. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660-665.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., Shao, F., 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514, 187-192.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O., Ugalde, R.A., 2000. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of bacteriology* 182, 4849-4855.
- Smith, L.D., Ficht, T.A., 1990. Pathogenesis of *Brucella*. *Critical reviews in microbiology* 17, 209-230.
- Sollberger, G., Choidas, A., Burn, G.L., Habenberger, P., Di Lucrezia, R., Kordes, S., Menninger, S., Eickhoff, J., Nussbaumer, P., Klebl, B., Kruger, R., Herzig, A., Zychlinsky, A., 2018. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science immunology* 3.
- Srinivasula, S.M., Poyet, J.L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z., Alnemri, E.S., 2002. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *The Journal of biological chemistry* 277, 21119-21122.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., Lopez-Otin, C., Virgin, H.W., Celli, J., 2012. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell host & microbe* 11, 33-45.
- Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A., Celli, J., 2008. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 9, 678-694.
- Steimle, A., Autenrieth, I.B., Frick, J.S., 2016. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International journal of medical microbiology : IJMM* 306, 290-301.
- Taguchi, Y., Imaoka, K., Kataoka, M., Uda, A., Nakatsu, D., Horii-Okazaki, S., Kunishige, R., Kano, F., Murata, M., 2015. Yip1A, a novel host factor for the activation of the IRE1 pathway of the unfolded protein response during *Brucella* infection. *PLoS pathogens* 11, e1004747.
- Tamura, M., Tanaka, S., Fujii, T., Aoki, A., Komiyama, H., Ezawa, K., Sumiyama, K., Sagai, T., Shiroishi, T., 2007. Members of a novel gene family, *Gsdm*, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics* 89, 618-629.
- Thurston, T.L., Matthews, S.A., Jennings, E., Alix, E., Shao, F., Shenoy, A.R., Birrell, M.A., Holden, D.W., 2016. Growth inhibition of cytosolic *Salmonella* by caspase-1 and caspase-11 precedes host cell death. *Nature communications* 7, 13292.
- Ting, J.P., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., Hoffman, H.M., Hugot, J.P., Inohara, N., Mackenzie, A., Maltais, L.J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L.A., Philpott, D., Reed, J.C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V., Ward, P.A., 2008. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 28, 285-287.

- Tripal, P., Bauer, M., Naschberger, E., Mortinger, T., Hohenadl, C., Cornali, E., Thurau, M., Sturzl, M., 2007. Unique features of different members of the human guanylate-binding protein family. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 27, 44-52.
- Tsolis, R.M., Young, G.M., Solnick, J.V., Baumler, A.J., 2008. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nature reviews. Microbiology* 6, 883-892.
- Vanaja, S.K., Russo, A.J., Behl, B., Banerjee, I., Yankova, M., Deshmukh, S.D., Rathinam, V.A.K., 2016. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* 165, 1106-1119.
- Velasquez, L.N., Delpino, M.V., Ibanez, A.E., Coria, L.M., Miraglia, M.C., Scian, R., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H., Barrionuevo, P., 2012. *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. *Microbes and infection* 14, 639-650.
- Vestal, D.J., Gorbacheva, V.Y., Sen, G.C., 2000. Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 20, 991-1000.
- Vigano, E., Mortellaro, A., 2013. Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. *European journal of immunology* 43, 2240-2245.
- Wallet, P., Benaoudia, S., Mosnier, A., Lagrange, B., Martin, A., Lindgren, H., Golovliov, I., Michal, F., Basso, P., Djebali, S., Provost, A., Allatif, O., Meunier, E., Broz, P., Yamamoto, M., Py, B.F., Faudry, E., Sjostedt, A., Henry, T., 2017. IFN-gamma extends the immune functions of Guanylate Binding Proteins to inflammasome-independent antibacterial activities during *Francisella novicida* infection. *PLoS pathogens* 13, e1006630.
- Wandel, M.P., Pathe, C., Werner, E.I., Ellison, C.J., Boyle, K.B., von der Malsburg, A., Rohde, J., Randow, F., 2017. GBPs Inhibit Motility of *Shigella flexneri* but Are Targeted for Degradation by the Bacterial Ubiquitin Ligase IpaH9.8. *Cell host & microbe* 22, 507-518 e505.
- Wang, J., Shao, Y., Wang, W., Li, S., Xin, N., Xie, F., Zhao, C., 2017a. Caspase-11 deficiency impairs neutrophil recruitment and bacterial clearance in the early stage of pulmonary *Klebsiella pneumoniae* infection. *International journal of medical microbiology : IJMM* 307, 490-496.
- Wang, S., Miura, M., Jung, Y., Zhu, H., Gagliardini, V., Shi, L., Greenberg, A.H., Yuan, J., 1996. Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1beta converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *The Journal of biological chemistry* 271, 20580-20587.
- Wang, W., Shao, Y., Li, S., Xin, N., Ma, T., Zhao, C., Song, M., 2017b. Caspase-11 Plays a Protective Role in Pulmonary *Acinetobacter baumannii* Infection. *Infection and immunity* 85.
- Weiss, D.S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., Moreno, E., 2005. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infection and immunity* 73, 5137-5143.
- WHO 2006. Brucellosis in humans and animals. In World Health Organization (World Health Organization, World Health Organization), pp. 1-102.
- Wilson, D., Thewes, S., Zakikhany, K., Fradin, C., Albrecht, A., Almeida, R., Brunke, S., Grosse, K., Martin, R., Mayer, F., Leonhardt, I., Schild, L., Seider, K., Skibbe, M., Slesiona, S., Waechter, B., Jacobsen, I., Hube, B., 2009. Identifying infection-

associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res* 9, 688-700.

- Wu, J., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., 2010. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Immunol* 30, 693-702.
- Wyatt, H.V., 2009. Brucellosis and Maltese goats in the Mediterranean. *Journal of Maltese History* 1, 4-19.
- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D.C., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J., Takeda, K. 2012. A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. In *Immunity*, pp. 302-313.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J., 2006. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *The Journal of biological chemistry* 281, 30299-30304.
- Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Flavell, R.A., Dietrich, W.F., Roy, C.R., 2006. The Bir1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nature immunology* 7, 318-325.
- Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Broggi, A., Ruan, J., Shi, J., Donado, C.A., Shao, F., Wu, H., Springstead, J.R., Kagan, J.C., 2016. An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science* 352, 1232-1236.
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., Shao, F., 2011. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477, 596-600.
- Zhu, Q., Zheng, M., Balakrishnan, A., Karki, R., Kanneganti, T.D., 2018. Gasdermin D Promotes AIM2 Inflammasome Activation and Is Required for Host Protection against *Francisella novicida*. *J Immunol* 201, 3662-3668.

9 – Anexos

9.1 – Artigos publicados durante o período do doutorado

2015 – 2019:

- Costa Franco MM, Marim F, Guimarães ES, Assis NRG, **Cerqueira DM**, Alves-Silva J, Harms J, Splitter G, Smith J, Kanneganti TD, de Queiroz NMGP, Gutman D, Barber GN, Oliveira SC. *Brucella abortus* Triggers a cGAS-Independent STING Pathway To Induce Host Protection That Involves Guanylate-Binding Proteins and Inflammasome Activation. *J Immunol*. 2018 Jan 15;200(2):607-622.
- Costa Franco MMS, Marim FM, Alves-Silva J, **Cerqueira D**, Rungue M, Tavares IP, Oliveira SC. AIM2 senses *Brucella abortus* DNA in dendritic cells to induce IL-1 β secretion, pyroptosis and resistance to bacterial infection in mice. *Microbes Infect*. 2019 Mar;21(2):85-93.
- Gomes MTR, **Cerqueira DM**, Guimarães ES, Campos PC, Oliveira SC. Guanylate-binding proteins at the crossroad of noncanonical inflammasome activation during bacterial infections. *J Leukoc Biol*. 2019 Mar 21.

9.2 – Artigo principal gerado a partir desse trabalho (em anexo)

- Cerqueira DM, Gomes MTR, Silva ALN, Rungue M, Assis NRG, Guimarães ES, Morais SB, Broz P, Zamboni DS, Oliveira SC. Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection. *PLoS Pathog*. 2018 Dec 27;14(12):e1007519.