

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Raiany Araujo Santos

**O PAPEL DA CASPASE-8 NO CONTROLE DA INFECÇÃO CAUSADA PELA
BACTÉRIA INTRACELULAR *BRUCELLA ABORTUS*.**

Belo Horizonte
2023

Raiany Araujo Santos

**O PAPEL DA CASPASE-8 NO CONTROLE DA INFECÇÃO CAUSADA PELA
BACTÉRIA INTRACELULAR *BRUCELLA ABORTUS*.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor(a) em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

Coorientadora: Dra. Daiane Maria Cerqueira

Belo Horizonte
2023

043

Santos, Raiany Araujo.

O papel da caspase-8 no controle da infecção causada pela bactéria intracelular *Brucella abortus* [manuscrito] / Raiany Araujo Santos. – 2023. 92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira. Coorientadora: Dra. Daiane Maria Cerqueira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Caspase 8. 3. Caspase 7. 4. *Brucella abortus*. 5. Inflamassomos. 6. Piroptose. 7. Imunidade Inata. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Daiane Maria Cerqueira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Genética
Instituto de Ciências Biológicas

ATA DE DEFESA DE TESE

| | |
|-----------------------|--|
| ATA DA DEFESA DE TESE | 177/2023 entrada |
| Raiany Araujo Santos | 1º/2019 CPF: 110.421.266-82 |

Às treze horas e trinta minutos do dia **28 de setembro de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**O papel da caspase-8 no controle da infecção causada pela bactéria intracelular Brucella abortus**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Sergio Costa Oliveira**, 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 de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq. | Instituição | CPF | Indicação |
|-----------------------------------|-------------|----------------|-----------|
| Sergio Costa Oliveira | UFMG | 327.651.855-49 | APROVADA |
| Vasco Ariston de Carvalho Azevedo | UFMG | 283.171.225-49 | APROVADA |
| Flavio Almeida Amaral | UFMG | 051.832.106-16 | APROVADA |
| Gilson Costa Macedo | UFJF | 031.526.546-93 | APROVADA |
| Leonardo Augusto de Almeida | UNIFAL | 055.921.086-80 | APROVADA |

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

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

Belo Horizonte, 28 de setembro de 2023.

Sergio Costa Oliveira- UFMG

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo- UFMG

Flavio Almeida Amaral- UFMG

Gilson Costa Macedo- UFJF

Leonardo Augusto de Almeida-UNIFAL



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Costa Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilson Costa Macedo, Usuário Externo**, em 28/09/2023, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Augusto de Almeida, Usuário Externo**, em 28/09/2023, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2662938** e o código CRC **F673FFC6**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Genética
Instituto de Ciências Biológicas

FOLHA DE APROVAÇÃO

"O papel da caspase-8 no controle da infecção causada pela bactéria intracelular Brucella abortus "

Raiany Araujo Santos

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Sergio Costa Oliveira
UFMG

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
UFMG

Flavio Almeida Amaral
UFMG

Gilson Costa Macedo

UFJF

Leonardo Augusto de Almeida

UNIFAL

Belo Horizonte, 28 de setembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Costa Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilson Costa Macedo, Usuário Externo**, em 28/09/2023, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Augusto de Almeida, Usuário Externo**, em 28/09/2023, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2662965** e o código CRC **6D39F728**.

Resumo

A morte celular programada (PCD) é um importante mecanismo da imunidade inata contra patógenos bacterianos. A resposta imune inata da PCD envolve as moléculas caspase-7 e caspase-8, entre outras. *Brucella abortus* é uma bactéria Gram-negativa que causa uma doença zoonótica denominada brucelose. A resposta imune inata contra esse patógeno envolve ativação de componentes do inflamassoma e indução de piroptose. No entanto, nenhum estudo até agora revelou o papel da caspase-7 ou caspase-8 durante esta infecção bacteriana. Aqui, demonstramos que a caspase-7 é dispensável para o processamento da caspase-1, secreção de IL-1 β e morte celular em macrófagos. Animais deficientes em caspase-7 demonstraram controlar a infecção por *B. abortus*, bem como os camundongos do tipo selvagem. Além disso, abordamos o papel da caspase-8 na ativação do inflamassoma e piroptose durante esta infecção bacteriana. Os macrófagos deficientes em caspase-8 secretaram quantidades reduzidas de IL-1 β que se igualam à diminuição da atividade da caspase-1 quando comparados às células do tipo selvagem. Macrófagos deficientes para caspase-8 mostraram liberação reduzida de Lactato desidrogenase (LDH) e da clivagem da gasdermina-D (GSDMD) quando comparados ao tipo selvagem, sugerindo que a caspase-8 pode desempenhar um papel importante na piroptose em resposta à *B. abortus*. Finalmente, os animais deficientes para caspase-8 demonstraram ser mais suscetíveis à infecção por *Brucella* quando comparados aos camundongos selvagens. No geral, este estudo contribui para uma melhor compreensão do envolvimento da caspase-7 e caspase-8 na imunidade inata contra a infecção por *B. abortus*.

Palavras-chave: caspase-8, caspase-7, *Brucella abortus*, inflamassoma, piroptose, imunidade inata

Abstract

Programmed cell death (PCD) is an important mechanism of innate immunity against bacterial pathogens. The PCD innate immune response involves the molecules caspase-7 and caspase-8, among others. *Brucella abortus* is a Gram-negative bacterium that causes a zoonotic disease termed brucellosis. The innate immune response against this pathogen involves activation of inflammasome components and induction of pyroptosis. However, no study has revealed the role of caspase-7 or caspase-8 during this bacterial infection. Here, we demonstrate that caspase-7 is dispensable for caspase-1 processing, IL-1 β secretion and cell death in macrophages. Animals deficient in caspase-7 have been shown to control *B. abortus* infection as well as wild type mice. Furthermore, we addressed the role of caspase-8 in inflammasome activation and pyroptosis during this bacterial infection. Macrophages deficient in caspase-8 secreted reduced amounts of IL-1 β that parallels with diminished caspase-1 activity when compared to wild type cells. Additionally, caspase-8 deficient macrophages showed reduced LDH release and gasdermin-D (GSDMD) cleavage when compared to wild type, suggesting that caspase-8 may play an important role in pyroptosis in response to *B. abortus*. Finally, caspase-8 deficient animals were more susceptible to *Brucella* infection when compared to wild type mice. Overall, this study contributes to a better understanding of the involvement of caspase-7 and caspase-8 in innate immunity against *B. abortus* infection.

Keywords: caspase-8, caspase-7, *Brucella abortus*, inflammasome, pyroptosis, innate immunity

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura do lipopolissacarídeo de <i>Brucella</i> | 15 |
| Figura 2: Modelo do ciclo intracelular de <i>Brucella</i> em macrófagos..... | 20 |
| Figura 3: Modelo esquemático de ativação do inflamassoma não canônico em resposta a infecção por <i>Brucella abortus</i> | 24 |
| Figura 4: As diferentes caspases e seus domínios..... | 25 |
| Figura 5: A produção de IL-1 β em resposta a <i>Brucella abortus</i> ocorre de maneira independente da caspase-7..... | 43 |
| Figura 6: A caspase-7 não participa da piroptose de macrófagos durante a infecção por <i>B. abortus</i> | 44 |
| Figura 7: O papel da caspase-7 no controle da infecção por <i>Brucella abortus in vivo</i> | 45 |
| Figura 8: Gel de Agarose de genotipagem de animais Caspase 8..... | 47 |
| Figura 9: A caspase-8 participa da clivagem da caspase-1 e secreção de IL-1 β em resposta a infecção por <i>B. abortus</i> : | 48 |
| Figura 10: A caspase-8 é importante para induzir a morte celular durante a infecção por <i>B. abortus</i> | 49 |
| Figura 11: A caspase-8 influencia na resistência a infecção <i>in vivo</i> por <i>Brucella abortus</i> | 50 |
| Figura 12: A caspase-8 participa na formação de granulomas hepáticos durante a infecção por <i>Brucella abortus</i> | 52 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela: 1 Reação de PCR Touchdown | 38 |
|---|----|

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

ATP: Adenosina trifosfato

ANOVA: Análise de variância

BB: *Brucella Broth*

BCV: Vacúolo contendo *Brucella*

BMDM: Macrófagos derivados de medula óssea

BSA: Albumina sérica bovina

CARD: *Caspase recruitment domain*

CASP1: Caspase-1

CASP11: Caspase-11

CASP3: Caspase-3

CASP7: Caspase-7

CASP8: Caspase-8

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

GSDMD: *Gasdermin-D*

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

HRP: *Horse radish peroxidase*

IFN: Interferon

IL-18: Interleucina 18

IL-1 β : Interleucina 1 beta

i.p: intraperitoneal

IRF: *Interferon regulatory factor*

LCCM: Meio Condicionado de células L929

LDH: lactato desidrogenase

LPS: Lipopolissacarídeo

LRR: *Leucine-Rich Repeat*

M-PER: *Mammalian Protein Extraction Reagent*

MOI: Multiplicidade de infecção

MyD88: *Myeloid differentiation primary response protein (88)*

min: minutes

ml: mililitros

NE: elastase de neutrófilos

NFκB: *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*

PAMP: Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PBS: Salina Tamponada com Fosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

PRR: Receptor de Reconhecimento Padrão

RE: retículo endoplasmático

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SBF: Soro Bovino Fetal

SD: desvio padrão

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

TLR: Receptor do Tipo Toll

TNF: Fator de Necrose Tumoral

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

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UPR: resposta a proteínas mal enoveladas

WT: Selvagem (*Wild-type*)

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 Introdução | 10 |
| 1.1 Brucelose no Brasil | 11 |
| 1.2 O gênero <i>Brucella</i> | 12 |
| 1.3 Fatores de Virulência..... | 14 |
| 1.4 Patogênese de <i>B. abortus</i> | 17 |
| 1.5 Resposta imune inata a <i>Brucella spp.</i> | 20 |
| 1.5.1 Inflamassomas | 21 |
| 1.6 Caspases | 24 |
| 1.7 Morte celular programada..... | 28 |
| 1.7.1 Apoptose | 28 |
| 1.7.2 Necroptose..... | 29 |
| 1.7.3 Piroptose..... | 30 |
| 1.8 Gasdermin D..... | 31 |
| 1.9 Os papéis da caspase-8 durante a ativação do inflamassoma..... | 32 |
| 2 Justificativa | 34 |
| 3 Objetivos | 36 |
| 3.1 Objetivo geral | 36 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 36 |
| 4 Material e Métodos | 37 |
| 4.1 Animais experimentais | 37 |
| 4.2 Bactéria e condições de cultivo | 37 |
| 4.3 Genotipagem de camundongos Caspase 8 | 37 |
| 4.4 Infecção <i>in vivo</i> | 38 |
| 4.5 Preparo de macrófagos derivados de medula osséa (BMDMs) | 39 |
| 4.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas | 39 |
| 4.7 Ensaio de liberação de lactate desidrogenase (LDH) | 39 |
| 4.8 Western Blotting | 40 |
| 4.9 Análise Histopatológica | 40 |
| 4.10 Análise estatística | 41 |
| 5 Resultados | 42 |
| 5.1 A secreção de IL-1 β em resposta a <i>B. abortus</i> ocorre de maneira independente da caspase-7..... | 42 |
| 5.2 Caspase-7 não participa da piroptose de macrófagos durante a infecção por <i>Brucella abortus</i> | 43 |

| | |
|---|----|
| 5.3 A ausência de caspase-7 não influencia no controle da infecção <i>in vivo</i> por <i>Brucella abortus</i> | 44 |
| 5.4 Genotipagem de Camundongos Caspase-8..... | 45 |
| 5.5 A caspase-8 participa da clivagem da caspase-1 e secreção de IL-1 β em resposta a <i>Brucella</i> | 47 |
| 5.6 A ausência da caspase-8 interfere na morte celular induzida pela infecção por <i>Brucella abortus</i> | 49 |
| 5.7 Ausência de caspase-8 aumenta a susceptibilidade a infecção por <i>Brucella abortus in vivo</i> | 50 |
| 5.8 Caspase-8 participa na formação de granulomas hepáticos durante a infecção por <i>B. abortus</i> | 51 |
| 6 Discussão | 53 |
| 7 Conclusão | 60 |
| 8 Referências | 61 |
| 9 Anexos | 77 |
| 9.1 Artigos publicados durante o período do doutorado | 77 |
| 9.2 Artigo principal gerado a partir deste trabalho | 77 |

1. Introdução

A brucelose é uma doença infecciosa causada pela bactéria do gênero *Brucella*. A doença afeta principalmente animais, como bovinos, ovinos, caprinos e suínos, mas também pode ser transmitida aos seres humanos (Proch et al. 2018). Bactérias do gênero *Brucella* foram descobertas pelo médico e microbiologista britânico Sir David Bruce. Em 1887, durante seu trabalho na ilha de Malta, Bruce investigou uma doença que afetava bovinos, causando aborto espontâneo em vacas. Ele notou a presença de uma bactéria específica nos tecidos dos animais infectados, que ele chamou de "*Bacillus abortus*". Em 1918, Alice Evans observou que os microrganismos descritos anteriormente por Bruce (1887) e Bang (1897) eram muito semelhantes entre si e, Meyer em 1920, propôs criar em homenagem a Bruce, o gênero *Brucella* (Bruce, 1887 ;Megid & Mathias, 2016).

A incidência de brucelose no mundo varia de acordo com as regiões e os sistemas de vigilância de cada país. A brucelose é considerada uma doença negligenciada e muitos casos não são devidamente notificados, dificultando uma estimativa precisa da incidência global (Lindahl et al. 2020). No entanto, de acordo com a Organização mundial da saúde (OMS) estima-se que ocorram cerca de 500.000 casos humanos de brucelose por ano em todo o mundo, sendo estes casos relatados em 86 países diferentes (Pappas et al., 2006). Estes números podem variar e estar sujeitos a subnotificação, especialmente em áreas onde a doença é endêmica. Segundo Ghanbari (2020), o número de casos humanos não notificados que apresentam sintomas clínicos não especificados é dez vezes maior, sendo assim, é uma das preocupações de saúde pública mais significativas. Pode afetar todos os grupos de idade e sexo, e seu controle em humanos depende da limitação da infecção em animais por meio de programas de vacinação e cuidados (Ghanbari et al. 2020).

A brucelose pode ser encontrada em muitos países ao redor do mundo, especialmente em regiões onde a pecuária é uma atividade econômica importante. Alguns países que relatam uma maior ocorrência de brucelose incluem:

- Países do Mediterrâneo e do Oriente médio, como Grécia, Turquia, Líbano, Egito e Arabia Saudita;
- Países da América Latina, como México, Brasil, Argentina e Peru;
- Países da África, como Nigéria, Quênia, Etiópia, Sudão e África do Sul;
- Países da Ásia, como Índia, China, Paquistão e Irã;
- Alguns países da Europa Central e Oriental, como Romênia, Bulgária e Ucrânia.

No entanto, é importante ressaltar que a incidência da brucelose pode variar ao longo do tempo e também depende de fatores como os sistemas de vigilância, práticas de controle da doença e ações de prevenção adotadas em cada país. A maioria destes surtos é de *Brucella abortus* (Hull e Schumaker 2018).

1.1 Brucelose no Brasil

A espécie de *Brucella* que é considerada endêmica e mais comumente associada a brucelose em animais e, ocasionalmente, em humanos, é a *Brucella abortus*. Essa espécie afeta principalmente o rebanho bovino e é responsável por causar a maior parte dos casos de brucelose animal no país. É importante destacar que existem outras espécies de *Brucella* que também podem ser encontrados no Brasil, como a *Brucella melitensis*, que afeta principalmente ovinos e caprinos e a *Brucella suis*, que afeta suínos. No entanto, a *Brucella abortus* é a espécie mais prevalente e associada a brucelose em bovinos no país (Neto et al. 2016; Poester, Gonçalves, e Lage 2002).

De acordo com o Ministério da Saúde, a incidência de brucelose humana pode ser subestimada devido a subnotificação de casos ou a falta de diagnóstico adequado em algumas áreas (Lindahl et al. 2020). Além disso, a brucelose animal é mais prevalente e pode servir como fonte de infecção para os seres humanos. A brucelose é uma doença de notificação compulsória no Brasil. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT foi instituído no Brasil pela Instrução Normativa Ministerial nº 02/2001 e regulamentado pela Instrução Normativa SDA nº 10/2017 com o objetivo de reduzir os impactos negativos dessas zoonoses na saúde

humana e animal. No entanto, após duas décadas desde a criação do PNCEBT, relatos de brucelose humana e animal ainda são notados em território brasileiro.

O tratamento da brucelose geralmente envolve o uso de antibióticos por um período prolongado, pois a doença pode ser persistente e recorrente. A duração do tratamento varia de acordo com a gravidade da infecção, podendo variar de 6 semanas a vários meses (Hull e Schumaker 2018). No caso dos animais, a vacinação é uma estratégia importante para controlar a disseminação da brucelose. Existem três vacinas disponíveis, sendo elas, RB51 e S19 para casos de *B. abortus* e a Rev1 para casos de *B. melitensis*. A RB51 é a vacina mais comumente usada, uma cepa atenuada de *Brucella abortus*. Essa vacina é administrada em bovinos, ovinos, caprinos e outros animais suscetíveis. Apesar das vacinas protegerem parcialmente a infecção nos animais, elas auxiliam diminuindo a probabilidade de um evento de aborto, quebrando o ciclo de transmissão e protegendo o rebanho (Hull e Schumaker 2018). Atualmente não existe nenhuma vacina desenvolvida e aprovada para o uso em humanos.

1.2 O gênero *Brucella*

O gênero *Brucella* compreende bacilos curtos ou em forma de cocos, que são dispostos isoladamente e, raramente, em cadeias curtas, não formam capsula nem esporos, são imóveis e gram-negativos (Corbel 1997). São considerados microorganismos aeróbios facultativos, apresentam temperatura de multiplicação na faixa de 20 a 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal, e um pH ótimo de 6,6 a 7,4 (Sola et al. 2014). A *Brucella* é um patógeno intracelular, durante uma infecção sobrevive e se multiplica nos macrófagos e células epiteliais; as bactérias se adaptam ao pH ácido, baixos níveis de oxigênio e baixos níveis de nutrientes (Köhler et al. 2002).

Atualmente, são reconhecidas oficialmente 12 espécies dentro do gênero *Brucella*. São elas:

- *B. abortus*: afeta principalmente bovinos, causando a brucelose bovina e humana;
- *B. melitensis*: afeta principalmente ovinos, caprinos, camelos e humanos;

- *B. suis*: afeta principalmente suínos, mas também pode infectar outros animais e seres humanos;
- *B. canis*: afeta cães e pode ser transmitida aos seres humanos;
- *B. ovis*: afeta ovinos;
- *B. neotomae*: encontrada em roedores silvestres, como ratos-cangurus;
- *B. ceti*: encontrada em mamíferos marinhos, como baleias e golfinhos;
- *B. pinnipedialis*: encontrada em focas e leões marinhos;
- *B. microti*: encontrada em roedores;
- *B. inopinata*: encontrada em humanos e anfíbios;
- *B. papiionis*: encontrada em babuínos;
- *B. vulpis*: encontrada em raposas vermelhas.

Essas espécies de *Brucella* podem apresentar variações em termos de patogenicidade, preferência de hospedeiros e distribuição geográfica. Atualmente, *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* estão relacionados a pecuária e a saúde pública (Moreno 2014), sendo a maioria das infecções humanas causadas por *Brucella melitensis* e *B. abortus* (Franco et al., 2007; Bang, 1897; Lawinsky et al., 2010; de Figueiredo et al., 2015).

Morfologicamente, as bactérias do gênero *Brucella* são divididas em dois grupos: *Brucella* lisa ou clássica, como *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*, e *Brucella* rugosa, como a *Brucella ovis* e a *Brucella canis* (Sangari e Agüero 1996). As espécies lisas são caracterizadas por terem colônias lisas e brilhantes quando cultivadas em meios de cultura adequados. As espécies rugosas apresentam colônias rugosas e opacas, possuindo uma aparência mais áspera e irregular em comparação com as colônias lisas. As bactérias lisas são frequentemente associadas à forma virulenta e conseqüentemente mais patogênica devido a integridade do seu lipopolissacarídeo (LPS). O LPS das bactérias lisas é mais completo e possui uma estrutura mais complexa, incluindo o lipídeo A, o núcleo oligossacarídeo e o O-polissacarídeo, que é um importante fator de virulência. As colônias rugosas não apresentam a cadeia O ou ela aparece com poucos resíduos, diminuindo a virulência da bactéria e influenciando na sua capacidade de causar doença (Caroff et al. 2002; Erridge, Bennett-Guerrero, e Poxton 2002).

1.3 Fatores de Virulência

A capacidade de replicação intracelular de *Brucella spp.* é fundamental para o estabelecimento da doença e a sobrevivência da bactéria, e este fato está diretamente relacionada a sua habilidade em evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Sangari e Agüero 1996). Nesse sentido, o gênero *Brucella* apresenta diversos mecanismos de virulência já descritos:

- **LPS:** O LPS é um fator de virulência essencial da *Brucella*. Em comparação com outras bactérias gram-negativas, como a *E.coli*, o LPS de *Brucella* possui características não clássicas (Cardoso et al. 2006; Christopher, L., e L. 2010) (Figura 1). O LPS de *Brucella* é menos tóxico e ativo do que o LPS clássico de *E.coli*, apresentando baixa pirogenicidade e sendo um fraco indutor do fator de necrose tumoral (TNF- α) (Christopher et al. 2010). O lipídio A encontrado em *B. abortus* tem características distintas, como a presença de diaminoglicose em vez de glucosamina, grupos acil mais longos e ligações amida conectando o lipídio A ao núcleo (Lapaque et al. 2005). Nas cepas de colônias lisas, o LPS liso (S-LPS) contém lipídio A com dois tipos de aminoglicose e ácido graxo, além do ácido β -hidroximirístico, núcleo composto por manose, glicose, quivosamina e cadeias O compostas por 4-formamido-4,6-didesoximanose. O LPS rugoso (R-LPS) em cepas de colônias rugosas é semelhante ao S-LPS, exceto pela redução ou ausência das cadeias O (Corbel 1997). As cepas com S-LPS conseguem evitar a apoptose das células hospedeira pela interação da cadeia O com o TNF- α , evitando a ativação do sistema imunológico e permitindo que as bactérias do gênero *Brucella* evitem a vigilância imunológica do hospedeiro (Fernandez-Prada et al. 2003).

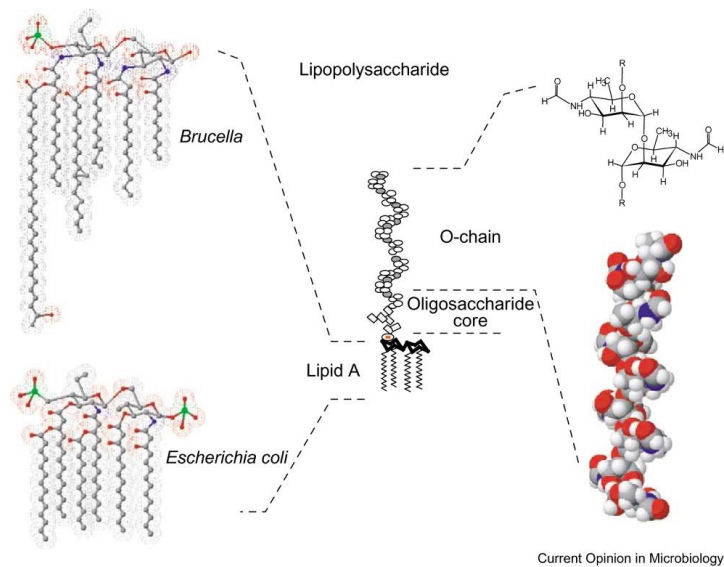


Figura 1: Estrutura do LPS de *Brucella*. O lipídeo A de *B. abortus* possui um esqueleto de diaminoglicose ligado por ligações amida a longos grupos acil, que difere do LPS clássico de *E. coli* (Lapaque et al. 2005).

- **Sistema de secreção do Tipo IV (T4SS):** O T4SS é um complexo multiproteico que desempenha um papel na secreção de macromoléculas bacterianas (Cascales e Christie 2003). Esse sistema é tipificado pelo operon *virB*, que codifica 12 proteínas e é presente em *Brucella* spp. (O'Cellaghan et al. 1999). A expressão do operon *virB* é regulada pelo *vjbR* (Seleem, Boyle, e Sriranganathan 2008). As cepas selvagens de *Brucella* são capazes de se multiplicar apenas no retículo endoplasmático (RE). Por outro lado, mutantes *virB* de *Brucella* spp. são incapazes de se multiplicar dentro do RE, seja por não conseguirem alcançá-lo ou por não se multiplicarem eficientemente dentro dele (Delrue et al. 2001). Em macrófagos, bactérias *Brucella* spp. são encontradas em vacúolos contendo *Brucella* (BCV); os quais interagem com o RE e são responsáveis pela formação de um compartimento especializado onde as *Brucellas* se multiplicam (Köhler et al. 2002). A aquisição da membrana do retículo endoplasmático depende de um sistema de secreção *virB* funcional. (Celli et al. 2003).

- **Superóxido dismutase e catalase:** Macrófagos infectados por *Brucella* produzem intermediários reativos de oxigênio (ROS), que são mecanismos primários de destruição das bactérias fagocitadas e impedem sua replicação intracelular (Gee et al. 2005; Seleem

et al. 2008). Os intermediários reativos de oxigênio, como o O_2^- (superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e OH^\cdot (radical hidroxila) são muito prejudiciais para a estrutura celular. Para neutralizar esses intermediários, os macrófagos produzem enzimas de defesa, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (Gee et al. 2005). A SOD é responsável por converter O_2^- para H_2O_2 e O_2 (oxigênio) (Gopal e Elumalai 2017), enquanto a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. As *Brucellas* possuem diferentes tipos de SOD, incluindo a SodA e SodC (Beck et al. 1990; Martin et al. 2012; Seleem et al. 2008), que atuam em diferentes compartimentos celulares para neutralizar os intermediários reativos de oxigênio. A catalase, embora não seja um fator de virulência essencial, desempenha um papel na proteção contra os danos pelo peróxido de hidrogênio (Seleem et al. 2008).

- **β -1-2-glucanos cíclicos (C β G):** O C β G de *Brucella* afeta o tráfego intracelular ao interagir com camadas lipídicas na superfície dos macrófagos. Esses glucanos estão envolvidos no controle da fusão entre fagossomo e lisossomo. Os mutantes que não possuem C β G são destruídos no fagolisossomo e não conseguem se replicar. No entanto, quando tratados por C β G, esses mutantes conseguem controlar a maturação do vacúolo e a fusão com o lisossomo, permitindo que cheguem ao RE e se multipliquem nesse compartimento (Arellano-Reynoso et al. 2005).

- **Urease:** A urease é uma enzima, que decompõe a ureia em ácido carbônico e amônio, aumentando assim o pH. Isso permite que a *Brucella* sobreviva em ambientes ácidos (Seleem et al. 2008). A *Brucella* possui dois operons de ureia, *ure-1* e *ure-2*, que codificam genes estruturais e acessórios relacionados a urease. A presença dessa urease pode conferir proteção à *Brucella* durante a passagem pelo trato digestivo, quando a bactéria infecta seu hospedeiro por via oral (Bandara et al. 2005).

- **Oxido nítrico redutase (NorD):** A redução do nitrato a dinitrogênio é um processo essencial para as bactérias quando há deficiência de oxigênio dentro da célula. Nos macrófagos infectados, ocorre a produção de óxido nítrico (NO), o qual a *Brucella* pode utilizar em benefício próprio. A enzima NorD de *Brucella* é composta por quatro tipos de

redutases: Nir (nitrito redutase), Nar (nitrato redutase), Nor (óxido nítrico redutase) e Nos (óxido nitroso redutase). A ação dessas enzimas ajuda a proteger a *Brucella* contra condições de baixo oxigênio dentro dos macrófagos, auxiliando em sua sobrevivência e adaptação (Seleem et al. 2008).

- **Sistema BvrR/BvrS:** O sistema BvrR/BvrS é essencial para a invasão, prevenção da fusão fagossoma-lissosoma e replicação intracelular de *Brucella*. Essas proteínas regulam a expressão de vários genes (Viadas et al. 2010), incluindo Omp3b (Omp22) ou Omp3a (Omp25a), que são proteínas de membrana, e influenciam a homeostase e estrutura da membrana (Manterola et al. 2007). Os mutantes para BvrR/BvrS apresentam alterações no LPS e não conseguem ativar a GTPase (Cdc42), o que impede a entrada nas células e resulta na persistência extracelular e falta de infecção (Guzmán-Verri et al. 2001). Além disso, o sistema BvrR/BvrS desempenha um papel na fusão limitada de lisossomos e no tráfego intracelular (López-Goñi et al. 2002). A regulação positiva da transcrição de *vjxB* pelo fator de transcrição *vjBR* também é mediada pelo sistema BvrR/BvrS (Martínez-Núñez et al. 2010).

1.4 Patogênese de *B. abortus*

A transmissão de *Brucella abortus* de animais para seres humanos ocorre principalmente por meio do contato direto com animais infectados ou produtos de origem animal contaminados. As principais vias de transmissão são:

- Ingestão de alimentos contaminados: a ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com a bactéria *Brucella abortus* é uma das principais formas de transmissão. Isso pode ocorrer ao consumir leite e queijos não pasteurizados, carnes mal cozidas ou derivadas de animais infectados (Pereira et al. 2021);

- Contato com tecidos ou fluidos infectados: O contato direto com tecidos, secreções ou fluidos de animais infectados, como placentas, fetos abortados, urina, fezes ou sangue

(Alexander, Schnurrenberger, e Brown 1981). A bactéria pode penetrar nas mucosas, como boca, nariz e olhos, ou através de pequenas lesões.

- Inalação de aerossóis contaminados: Em situações muito específicas, como em laboratórios de diagnóstico, indústrias de processamento de produtos de origem animal e laboratórios de pesquisa, a inalação de aerossóis contaminados com *Brucella* também pode levar a infecção (Lawinsky et al., 2010; Glynn & Lynn, 2008).

É importante destacar que a *Brucella abortus* não é altamente contagiosa entre seres humanos. A transmissão entre humanos é rara e geralmente ocorre apenas em situações muito específicas, como transmissão de mãe para o filho durante a gravidez, por meio da amamentação, após transfusão de sangue, transplante de medula óssea e relação sexual (Megid, 2016).

Em humanos, o período de incubação da brucelose varia de uma a cinco semanas, podendo prolongar-se por meses e apresentar uma ampla variedade de sintomas e manifestações clínicas inespecíficas. Os sintomas mais comuns incluem febre intermitente, calafrios, fadiga, dores musculares e articulares, sudorese noturna, cefaleia, perda de apetite e aumento dos linfonodos (Lawinsky et al. 2010). Em casos graves, a brucelose pode levar a complicações. Por exemplo, pode ocorrer o envolvimento do sistema nervoso central, resultando em meningite ou encefalite. Além disso, a infecção crônica pode causar problemas articulares, problemas cardíacos, inflamação dos testículos em homens e aborto espontâneo em mulheres grávidas (Kurdoglu et al. 2010; Solera 2010).

As bactérias do gênero *Brucella* tem a capacidade de sobreviver e se multiplicar tanto em células fagocíticas como em células não fagocíticas. Macrófagos, células dendríticas e células trofoblásticas são os principais alvos dessa bactéria (Celli 2006; N. Xavier et al. 2014). Durante a invasão, a *Brucella* se transloca através da camada de células epiteliais da mucosa, sendo fagocitada por fagócitos profissionais. Após a fagocitose, a *Brucella* sobrevive dentro de células não fagocíticas até 72 horas, supera a barreira epitelial e então invade as células fagocíticas. Cerca de 10% dessas bactérias conseguem

sobreviver a essa fase inicial. Nos macrófagos, o patógeno evita a resposta imunológica do hospedeiro, permitindo sua multiplicação e disseminação para outros tecidos através dos gânglios linfáticos se translocando para outros órgãos (Kim 2015).

Após a internalização pelas células fagocíticas, a *Brucella* interage com o compartimento endossômico inicial, formando um vacúolo chamado de BCV (*Brucella containing vacuole*), marcado pelos marcadores Rab5 e EEA1 (Pizarro-Cerdá et al. 1998; Pizarro-Cerdá, Moreno, e Gorvel 2000). A regulação da maturação do BCV em macrófagos e células epiteliais é mediada pelos β -1,2- glucanos, que também modificam as jangadas lipídicas ricas em colesterol na membrana do BCV (Arellano-Reynoso et al. 2005). A interação com a rede endocítica ocorre por cerca de 10 minutos (Pizarro-Cerdá et al. 1998) e leva a acidificação do BCV, o que resulta em alterações na expressão dos genes bacterianos e promove a sobrevivência da célula hospedeira (Neta et al. 2010). O BCV evita a fusão com endossomos tardios e lisossomos devido aos β -glucanos e LPS presentes (Celli 2006; Gorvel e Moreno 2002), porém, ele se transforma em um BCV intermediário, marcado por LAMP-1 e RAb-7, indicando a interação com compartimentos endossomais/lisossomais tardios (von Bargen, Gorvel, e Salcedo 2012; Gomez et al. 2013; Starr et al. 2008). Essa interação transitória é controlada e permite a expressão de fatores bacterianos ácidos, incluindo o gene *virB*, que codifica o T4SS (von Bargen et al. 2012; Starr et al. 2008). O T4SS é responsável pela injeção de proteínas efetoras no citoplasma da célula hospedeira e regula o tráfego intracelular do autofagossomo para o RE, desempenhando um papel essencial na replicação da *Brucella* no interior da célula (de Jong et al., 2008; Celli, 2015). Após aproximadamente 1 hora da internalização, as bactérias encontram-se dentro do BCV tardio, que é marcado por LAMP-1 e Sec61 β (calreculina) (Pizarro-Cerdá et al. 1998).

A etapa final do tráfego intracelular da *Brucella* envolve a aquisição de marcadores característicos do RE, como calnexina, calreticulina e Sec61 β (Pizarro-Cerdá et al. 1998). O RE é o compartimento adequado para a replicação de *Brucella* (Pizarro-Cerdá et al. 1998). A replicação ocorre principalmente no BCV replicativo (rBCV) (Figura 2) (de Bolle et al. 2015; Celli 2015). A formação do rBCV ocorre pela fusão do BCV tardio com

cisternas do RE, permitindo a transferência do vacúolo da via endocítica para a via secretória. Esse processo envolve a interceptação dos sítios de saída do RE pelo BCV tardio para sua conversão em rBCV (Celli, Salcedo, e Gorvel 2005). As bactérias mutantes para o sistema de secreção do tipo IV *virB* não conseguem realizar essas interações com os sítios de saída do RE (Celli et al. 2003; Comerci et al. 2001; Delrue et al. 2001). Após 48h de infecção, pode-se observar a presença de *B. abortus* em estruturas multimembranares semelhantes a autofagossomos, chamados de aBCV. Esses vacúolos são importantes na liberação de *B. abortus* da célula infectada e na disseminação para células vizinhas. O aBCV desempenha um papel fundamental na conclusão do ciclo intracelular de *B. abortus* (Starr et al. 2012).

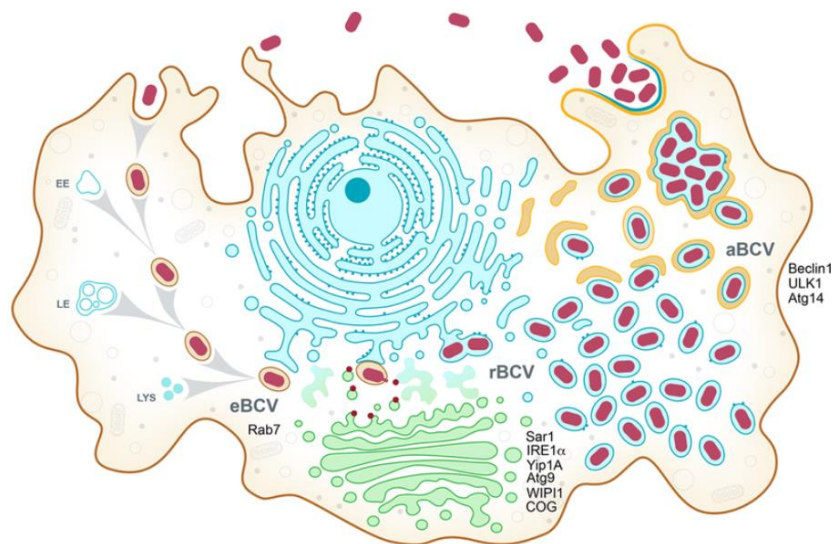


Figura 2: Modelo do ciclo intracelular de *Brucella* em macrófagos (Celli 2019)

1.5 Resposta imune inata contra a *Brucella* spp.

A imunidade inata desempenha um papel importante no sistema imunológico em resposta a infecção por *Brucella*. O primeiro mecanismo de defesa do sistema imune inato é detectar patógenos através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e, em seguida, responder rapidamente produzindo citocinas e moléculas antimicrobianas

(Kawai e Akira 2011). O reconhecimento bacteriano mediado pelos PRRs identifica padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são componentes microbianos conservados (Albiger et al. 2007). Vários receptores foram descritos como responsáveis por esse reconhecimento, tais como os receptores Toll-like (TLRs) (Kumar, Kawai, e Akira 2011), os receptores NOD-like (NLRs), e alguns sensores de DNA, como o AIM2 (ausente no melanoma 2) (Takaoka et al. 2007), cGAS (GMP-AMP sintase cíclica) (Sun et al. 2013) e STING (estimulador de genes de interferon) (Ishikawa e Barber 2008). Esses receptores participam de vias de sinalização que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e interferon do tipo I, que são cruciais na defesa do hospedeiro contra vários patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* (Manzanillo et al. 2012), *Listeria monocytogenes* (Stockinger et al. 2004), *Francisella tularensis* (Jones et al. 2010) e *Brucella abortus* (Gomes et al. 2013; Huang et al. 2005).

1.5.1 Inflamassomas

Os inflamassomas são complexos de proteínas localizados no citoplasma que funcionam como sensores de PAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados ao dano). Eles desempenham um papel essencial na resposta imune inata, atuando como guardiões no citosol e controlando 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). A secreção dessas citocinas depende do inflamassoma, e é crucial para o estabelecimento de uma resposta imune adequada contra diversos patógenos. Além disso, a caspase-1 também está envolvida na indução de piroptose (Lamkanfi e Dixit 2009).

A ativação do inflamassoma requer dois sinais distintos. O primeiro sinal, chamado de “priming”, prepara as células, aumentando a expressão dos componentes do inflamassoma como a pró-IL-1 β , e pró-IL-18, por exemplo. O segundo sinal desencadeia a montagem e ativação do inflamassoma propriamente dito, levando a ativação da caspase-1 e consequente secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 (Kayagaki et al. 2015).

Existem duas formas que os inflamassomas podem ser ativados, sendo a forma canônica uma delas. Nessa modalidade, o inflamassoma é composto por um sensor, um adaptador e um executor. Os sensores são ativados quando reconhecem PAMPs ou DAMPs, que posteriormente recrutam a proteína adaptadora chamada ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD). ASC se liga entre o sensor e o adaptador por meio de interações entre os seus domínios pirina-pirina. O ASC se agrega e forma fibrilas longas que, por meio de seu domínio CARD, têm a capacidade de recrutar caspase-1 (Fernandes-Alnemri et al. 2007; Proell et al. 2013). Os dímeros da caspase-1 recrutada passam por autoproteólise e ativação, resultando na clivagem da pró-IL-1 β , pró-IL-18 e também da Gasdermina-D (GSDMD). Após a clivagem, GSDMD desempenha um papel crucial ao iniciar um processo de morte celular inflamatória chamado piroptose.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa revelaram que a presença da molécula AIM2 é essencial para o controle da infecção por *Brucella abortus* em camundongos. Observou-se que a ausência dessa molécula tornou os animais mais susceptíveis a infecção em intervalos de 1,3 e 6 semanas, quando comparados aos animais C57BL/6. Além disso, foi constatado que o AIM2 co-localiza com o DNA de *B. abortus* nos macrófagos dos animais C57BL/6, conforme relatado por Costa Franco et al., 2018 e Gomes et al., 2013. Foi observado que a molécula NLRC4 não é necessária para o reconhecimento da *B. abortus*. Macrófagos que possuem deficiência de NLRC4 são capazes de ativar caspase-1 e secretar IL-1 β em resposta a esse patógeno de forma igual aos macrófagos controle de C57BL/6 (Gomes et al. 2013). Em estudo realizado em 2013, o nosso grupo demonstrou que macrófagos com deficiência em NLRP3 ou ASC apresentaram uma redução na secreção de IL-1 β e na ativação de caspase-1 em comparação com macrófagos C57BL/6. Além disso, quando os macrófagos C57BL/6 foram infectados com uma cepa de *B. abortus* que era deficiente no sistema de secreção do tipo IV *virB*, houve uma diminuição na secreção de IL-1 β em comparação aos macrófagos infectados com a cepa selvagem da bactéria. Esses resultados sugerem que *B. abortus* também é capaz de ativar o inflamassoma composto por NLRP3/ASC, resultando na 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).

O inflamassoma não-canônico ocorre quando o LPS intracelular é reconhecido pela caspase-11. Nessa via, a caspase-11 é ativada pelo LPS e cliva diretamente a GSDMD, resultando na formação de poros. Além disso, ocorre a ativação do NLRP3 através do efluxo de K⁺ (potássio) e ocorre a secreção de IL-1 β e IL-18 (Kayagaki et al. 2015). A caspase-11 possui uma especificidade de substrato mais restrita do que a caspase-1, com preferência significativa por GSDMD em vez da pró-IL-1 β e pró-IL-18 (Gonzalez Ramirez et al. 2018). O inflamassoma não canônico de caspase-11 desempenha um papel crítico na defesa do hospedeiro contra bactérias Gram-negativas intracelulares. Foi observado que a ativação desse inflamassoma pode ser desencadeado por bactérias Gram-negativas capazes de ativar NLRP3 (Rathinam, Vanaja, e Fitzgerald 2012). Em 2013, estudos demonstraram que a presença de LPS intracelular desencadeia a ativação do inflamassoma pela via não canônica, indicando a existência de um receptor intracelular para o LPS. Esse receptor reconhece especificamente o lipídeo A hexa-acilado ou penta-acilado do LPS (Hagar et al. 2013; Kayagaki et al. 2013).

No contexto da infecção por *Brucella abortus*, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a *B. abortus* é capaz de desencadear a ativação do inflamassoma não canônico dependente de caspase-11 e de GSDMD (Figura 3) (Cerqueira et al. 2018). Neste trabalho, o LPS de *B. abortus* foi identificado como o PAMP responsável pela ativação de caspase-11. Além disso, constatamos que a *Brucella* é capaz de induzir a formação de poros e morte celular por piroptose, de forma dependente de caspase-11, em BMDMs. Em estudos *in vivo*, observamos que camundongos deficientes em caspase-11 ou GSDMD foram mais suscetíveis a infecção por *B. abortus* em comparação com camundongos selvagens. Estes resultados demonstram que Gasdermina-D e caspase-11, desempenham um papel importante no controle da replicação de *B. abortus* em camundongos (Cerqueira et al. 2018).

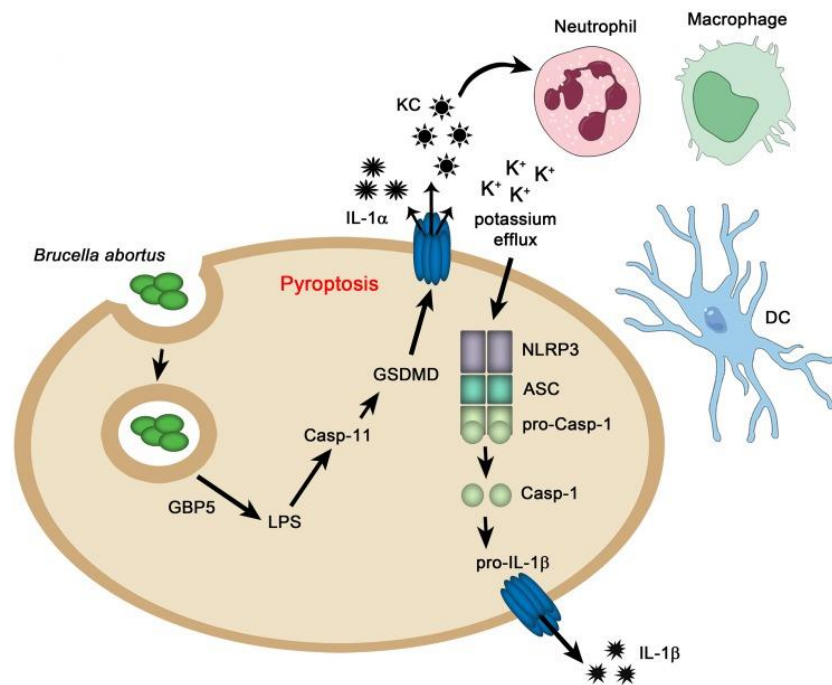


Figura 3: Modelo esquemático de ativação do inflamassoma não canônico em resposta a infecção por *Brucella abortus* (Cerqueira et al. 2018)

1.6 Caspases

As caspases são enzimas endopeptidases responsáveis por clivar seus substratos em seqüências de aminoácidos específicas. Cada tipo de caspase possui uma especificidade única, mas todas elas compartilham a característica de clivar os substratos após um resíduo de ácido aspártico, o que lhes rendeu o nome de caspases (o “c” refere-se à cisteína e o “asp” refere-se ao ácido aspártico) (Alnemri et al. 1996). Essas enzimas são classificadas como zimogênios, ou seja, elas se encontram inativas em seu estado inicial e necessitam de clivagem para se tornar ativas. A clivagem da caspase expõe um domínio contendo uma cisteína e uma arginina. A arginina mantém o resíduo de ácido aspártico do substrato no lugar, permitindo que a cisteína protease realize a clivagem do substrato logo após seu resíduo de ácido aspártico.

As caspases são divididas em duas principais categorias: caspases inflamatórias e caspases apoptóticas. As caspases inflamatórias incluem caspase-1, -11 (-11 em camundongos, -4 e -5 em humanos) e -12. Já as caspases apoptóticas incluem caspase -2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10 (Man e Kanneganti 2016). A caspase-8 pode ser classificada

tanto como uma caspase apoptótica quanto inflamatória. A visão tradicional é que tanto a dimerização quanto a clivagem são necessárias para ativar as caspases. As caspases conhecidas como pró-caspases, possuem 3 regiões distintas: o pró-domínio, a subunidade grande e a subunidade pequena, com locais de clivagem separando as diferentes subunidades (Figura 4A). A ativação da caspase requer a clivagem desses locais, seja por outra protease ou pela própria caspase. Além disso, o pró-domínio pode conter sítios de ligação que conectam a caspase a complexos de sinalização ou moléculas adaptadoras que iniciam a via de ativação (Anon 2011). As caspases-1, -2, -9, -11 e -12 possuem um domínio de ativação e recrutamento de caspase (CARD), enquanto caspase-8 e -10 possuem um domínio efetor de morte (DED) (Creagh 2014).

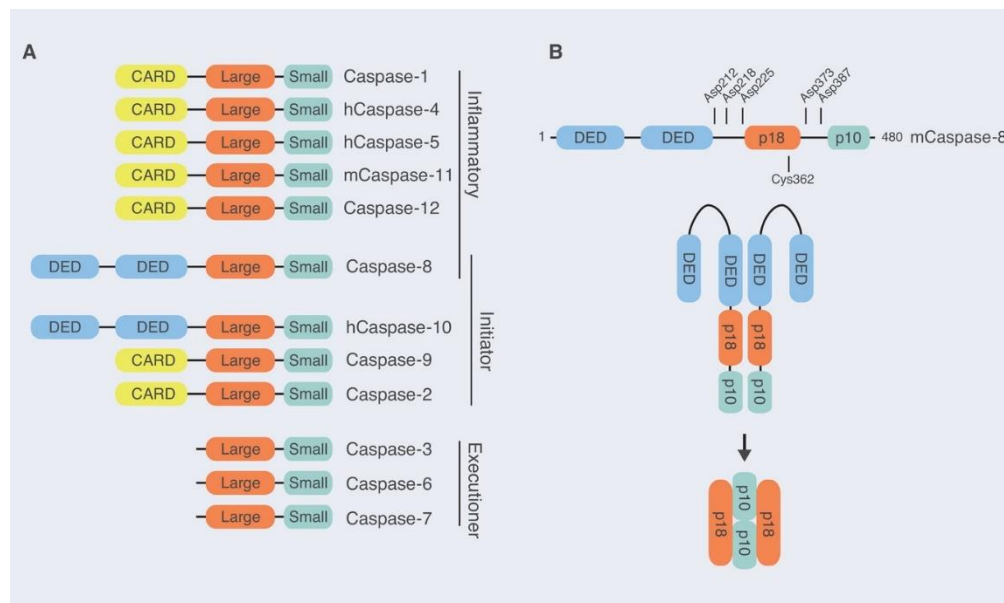


Figura 4: Esquema mostrando as diferentes caspases e seus domínios (A). Resíduos importantes envolvidos na ativação da caspase-8 em camundongo (B) (Orning e Lien 2021).

As caspases possuem diferentes especificidades em relação aos seus substratos, sendo determinadas pelas sequências de aminoácidos presentes antes do local de clivagem do ácido aspártico do substrato. Para que ocorra a clivagem, o substrato deve ser capaz de se ligar ao domínio ativo da caspase, permitindo a exposição do resíduo de ácido aspártico. Por exemplo, tanto a caspase-1 quanto a caspase-11 são capazes de clivar a GSDMD, porém apenas a caspase-1 pode realizar a clivagem adicional da pró-IL-1 β e

da pró-IL-18 (Gonzalez Ramirez et al. 2018). No entanto, estudos recentes têm mostrado uma considerável sobreposição entre os substratos das diferentes caspases, e dependendo da concentração específica da caspase, várias caspases podem clivar, em diferentes graus, alguns dos mesmos substratos (Poreba et al. 2019).

A caspase-7 pertence ao grupo das caspases executoras (Lamkanfi et al. 2002) e, anteriormente era considerada redundante com a caspase-3, devido ao compartilhamento de uma sequência de reconhecimento de peptídeo ideal e diversos substratos de proteínas endógenas em comum. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que essa caspase desempenha papéis distintos e não redundantes no apoptose e inflamação (Slee, Adrain, e Martin 2001). Ambas são ativadas proteoliticamente pelas caspases 8 e 9 durante a apoptose induzida por receptor de morte e dano ao DNA. Em estudos utilizando macrófagos estimulados com LPS e ATP, ou infectados com a bactéria Gram-negativa *Salmonella typhimurium*, foi demonstrado que a caspase-1 é necessária para a ativação proteolítica da caspase-7, delineando uma via de ativação NLR/ caspase-1/ caspase-7 em resposta a estímulos microbianos (Lamkanfi et al. 2008). Além disso, estão surgindo evidências de outras funções não redundantes da caspase-7 em modelos de infecção e inflamação. Por exemplo, macrófagos deficientes em caspase-7 tem menor capacidade de restringir a replicação intracelular de *Legionella pneumophila* (Akhter et al. 2009). Camundongos deficientes em caspase-7 também foram relatados como resistentes à letalidade causada por injeções intraperitoneais de LPS, um modelo frequentemente usado para síndrome de choque séptico (Lamkanfi et al. 2009).

Assim como a caspase-1, a caspase-8 é ativada por meio da dimerização. Essa dimerização desencadeia a atividade de autoprocessamento da pró-caspase-8, resultando na clivagem e liberação da caspase-8 ativa no citosol. Uma vez ativa, a caspase-8 pode clivar outros substratos, como a caspase-3 e a caspase-7, induzindo assim a apoptose (Martin et al., 1998; Muzio et al., 1998; Yang; Chang; Baltimore, 1998). Alguns estudos sugerem que, semelhante à caspase-1, a caspase-8 pode ter certas propriedades catalíticas (Kang et al., 2008; Philip et al., 2016). A atividade da caspase-8

pode ocorrer pela oligomerização de 2 moléculas da pró-caspase-8 ou pela oligomerização da pró-caspase-8 com a proteína inibitória FLICE homóloga de caspase-8 proteoliticamente inativa (cFLIP_L) (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002). Essa atividade pode permitir o autoprocessamento canônico em homodímeros de caspase-8, ou inibir a necroptose através da clivagem de RIPK1 e RIPK3, além de induzir a expressão de citocinas inflamatórias (Oberst et al., 2011; Lin et al., 1999; Feng et al., 2007; Philip et al., 2016).

Uma vez que pró-caspase-8 forma um homodímero, ela é clivada nas posições Asp373 e Asp387 (caspase-8 de camundongo), localizadas entre as subunidades catalíticas grandes e pequenas (Figura 4B). Esta clivagem resulta na geração de um fragmento p10 (pequena subunidade catalítica) e nos fragmentos p41 e p43, que são derivados de duas isoformas da caspase-8. Em seguida, ocorre a clivagem dos fragmentos p41 e p43 nas posições Asp212 e Asp218, levando à liberação do pró-domínio e da grande subunidade catalítica p18. A caspase-8 cataliticamente ativa consiste em 2 subunidades grandes p18 e duas subunidades pequenas p10, que são geradas quando o dímero da pró-caspase-8 é clivado. Essas subunidades ativas da caspase-8 são capazes de clivar as caspases-3 e -7, induzindo assim a apoptose (Chang et al. 2003).

A atividade catalítica da caspase-8 é crucial para o desenvolvimento embrionário em camundongos, pois camundongos deficientes em caspase-8, bem como camundongos com caspase-8 cataliticamente inativa (mutantes C362A ou S), morrem antes do nascimento devido à necroptose mediada por MLKL (Alvarez-Diaz et al., 2016; Newton et al., 2019; Fritsch et al., 2019). Curiosamente, parece que a primeira etapa de clivagem durante a ativação da caspase-8, resultando na liberação da subunidade pequena, desempenha duas funções: reduzir significativamente a atividade de autoprocessamento da caspase-8 e permitir maior acesso aos substratos da caspase-8, como caspase-3, caspase-7 e Bid (Hughes et al. 2009).

1.7 Morte celular programada

Existem diversas formas de morte celular regulada que ocorrem em resposta a diferentes sinais. Alguns exemplos incluem apoptose, necroptose, piroptose, ferroptose, morte celular dependente de autofagia, morte celular dependente de lisossoma e muitos outros. Dentre essas formas de morte celular, a apoptose, a necroptose e a piroptose desempenham papéis importantes na imunidade e em doenças infecciosas e inflamatórias.

A apoptose é a primeira via de morte celular programada a ser descoberta e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na sobrevivência de organismos eucarióticos. Por sua vez, a necroptose e a piroptose são formas inflamatórias de morte celular que estão associadas à liberação do conteúdo celular e desempenham funções essenciais em nosso sistema imunológico (Schwarzer, Laurien, e Pasparakis 2020).

1.7.1 Apoptose

A apoptose desempenha um papel essencial na remoção de células excessivas ou danificadas. Por exemplo, o desenvolvimento dos dedos em embriões humanos ocorre através da apoptose que ocorre nas células entre os dedos. Durante infecções microbianas, a apoptose auxilia na destruição e remoção de células infectadas (Speir et al., 2016; Ebert et al., 2015). O conteúdo da célula apoptótica é retido dentro de membranas celulares, à medida que a membrana plasmática começa a formar “bolhas” ou pequenos corpos apoptóticos ligados a ela. Historicamente, a apoptose é considerada uma forma de morte celular “silenciosa”, não associada à inflamação, uma vez que os DAMPs inflamatórios permanecem contidos nas membranas celulares. As características da apoptose incluem a formação de bolhas de membrana, clivagem do DNA que pode ser observada como um padrão de escada de DNA regular em um gel de agarose, condensação nuclear e fragmentação, encolhimento celular e a exposição de sinais de “eat me” na membrana plasmática, como a inversão da fosfatidilserina da camada interna para a externa da membrana celular (Galluzzi et al. 2018).

A apoptose pode ser classificada como intrínseca ou extrínseca, dependendo da origem do sinal que desencadeia a morte celular. A apoptose intrínseca é desencadeada por estresses intracelulares, como danos ao DNA, privação de nutrientes, estresse do retículo endoplasmático, hipóxia ou radicais livres (Czabotar et al., 2014; Pihán; Carreras-Sureda; Hetz, 2017; Roos; Thomas; Kaina, 2016; Vitale et al., 2017). Por outro lado, a apoptose extrínseca é iniciada por sinalização proveniente do ambiente extracelular através de receptores de superfície celular. Exemplos de ligantes incluem o Fator de necrose tumoral (TNF) que se liga ao receptor de TNF (TNFR), o fator indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL) que se liga aos receptores TRAIL (DR4 e DR5) ou o ligante FAS (FASL) que se liga ao receptor FAS (CD95) (Wilson, Dixit, e Ashkenazi 2009).

A ligação desses ligantes aos seus respectivos receptores desencadeia o recrutamento de proteínas como o domínio de morte associado a TNFR (TRADD), domínio de morte associado a FAS (FADD) e a proteína quinase 1 de interação com o receptor (RIPK1), resultando na ativação da caspase-8. É importante ressaltar que existe uma interconexão entre essas vias, uma vez que, em certas células, a caspase-8 pode desencadear a via intrínseca por meio da clivagem do agonista de morte do domínio de interação de homologia 3 de BCL2 (BID), promovendo a ativação subsequente de BAX e MOMP (Li et al. 1998).

1.7.2 Necroptose

A necroptose é uma forma programada de morte celular necrótica inflamatória que envolve as quinases RIPK1 e RIPK3, juntamente com a pseudoquinase formadora de poros MLKL, responsável pela perfuração da membrana celular. Além da apoptose, a necroptose também pode ser desencadeada a jusante do complexo TNFR. Em certas condições, RIPK1 pode iniciar a necroptose induzida por RIPK3 em vez da apoptose mediada pela caspase-8. A fosforilação de RIPK3 resulta na oligomerização da proteína MLKL, que se insere na membrana plasmática, levando à formação de poros, instabilidade iônica, influxo de água, edema celular e ruptura (He et al., 2009; Dondelinger et al., 2014; Xia et al., 2016).

O complexo TNFR, por meio de RIPK1, pode resultar na transcrição gênica mediada por NF- κ B e na indução de morte. Muitos vírus e bactérias têm componentes que visam essa via para bloquear a transcrição de genes inflamatórios, a fim de evitar uma resposta imunológica intensa. Por outro lado, o RIPK1 pode direcionar as células para a morte como uma forma de combater esses patógenos. Em uma batalha entre hospedeiro e o patógeno, certos patógenos também evoluíram mecanismos para combater a indução da morte celular. Portanto, a necroptose pode funcionar como uma via alternativa de morte celular quando a apoptose é inibida.

1.7.3 Piroptose

A piroptose é uma forma de morte celular que pode ser classificada como um subgrupo da necrose. Mecanicamente, a piroptose é desencadeada pela ativação do inflamassoma, um processo que apresenta semelhanças com o mecanismo da apoptose intrínseca. No entanto, o resultado final da piroptose se assemelha mais à necroptose, com a formação de poros, permeabilização da membrana e edema celular. Por muito tempo, a piroptose foi considerada como um tipo especial de apoptose mediada pela caspase-1 em monócitos em resposta a determinados desafios bacterianos. No entanto, a descoberta de que a caspase-11 também pode desencadear a piroptose por meio da detecção de LPS intracelular (Shi et al., 2014; Kayagaki et al., 2011; Kayagaki et al., 2013; Hagar et al., 2013), expandiu amplamente o papel dessa forma de morte celular no combate a bactérias intracelulares e na mediação do choque séptico.

A piroptose é agora reconhecida como uma via crucial na biologia celular das células imunes inatas, desempenhando um papel na liberação de citocinas inflamatórias, remoção do nicho de replicação do patógeno e encapsulamento de bactérias intracelulares dentro dos resíduos celulares das células piroptóticas (Miao et al., 2010b; Jorgensen et al., 2016a). Em 2015, os grupos de pesquisa liderados por Feng Shao e Vishva Dixit identificaram independentemente a proteína GSDMD como uma molécula efetora que controla a piroptose (SHI et al., 2015; KAYAGAKI et al., 2015). Devido à capacidade de outras proteínas da família da gasdermina, como a gasdermina E, de induzir poros e

citotoxicidade semelhante, argumenta-se que a piroptose pode ser definida como uma forma de morte celular mediada pela gasdermina (Galluzzi et al. 2018).

Embora a caspase-8 não seja considerada a principal molécula envolvida na piroptose, evidências crescentes sugerem que ela pode desempenhar um papel importante nesse processo. Parece que caspase-8 pode regular os inflamassomas canônicos e também ativar diretamente a GSDMD, contribuindo assim para a indução da piroptose.

1.8 Gasdermina D

GSDMD foi recentemente descoberta como uma proteína capaz de desempenhar um papel crucial durante a piroptose. A GSDMD é composta por um domínio N-terminal e um domínio C-terminal, sendo que este último atua como um inibidor. A clivagem de GSDMD pela caspase-1 e caspase-11 libera o domínio N-terminal, que é capaz de se oligomerizar e se inserir na membrana plasmática. Isso resulta na formação de poros, inchaço celular, ruptura da integridade da membrana, explosão e morte celular. Curiosamente, a expressão apenas do domínio N-terminal é suficiente para desencadear a piroptose. O domínio N-terminal tem uma forte afinidade por fosfoinosídeos e cardiolipina, que são lipídios presentes na membrana plasmática da célula e na membrana bacteriana interna, respectivamente. Essa ligação promove a oligomerização dos protômeros de GSDMD, resultando na formação de poros com um diâmetro interno de 10 a 15 nm (Ding et al., 2016; Liu et al., 2016; Aglietti et al., 2016; Sborgi et al., 2016). Esses poros permitem o fluxo de água, íons como o potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}), além de permitir a passagem de pequenas citocinas como IL-1 β e IL-18.

Estudos recentes revelaram que, em neutrófilos, a clivagem da GSDMD pode ocorrer independentemente das caspases, mas é dependente da serino protease ELANE, específica para neutrófilos (Kambara et al. 2018). Acredita-se que a ELANE seja liberada de grânulos citoplasmáticos no citosol de neutrófilos durante o envelhecimento e cliva a GSDMD antes do local de clivagem da caspase-1. O fragmento resultante da clivagem de GSDMD específico para neutrófilos também é capaz de induzir a morte celular lítica. Além disso, dois estudos demonstraram o envolvimento de GSDMD na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Chen et al., 2018; Sollberger et al.,

2018). Também foi observado que a GSDMD pode ser clivada pela catepsina G, o que leva à inflamação (Burgener et al. 2019). Essas descobertas destacam o papel multifuncional da GSDMD em diferentes contextos celulares e processos inflamatórios.

1.9 Os papéis da caspase-8 durante a ativação do inflamassoma

Embora caspase-8 possa não desempenhar um papel essencial durante a ativação canônica do inflamassoma em células selvagens (WT), estudos recentes revelaram que, uma vez que o inflamassoma é ativado, mas a piroptose está bloqueada, a caspase-8 pode desempenhar um papel na indução da morte celular. Isso foi observado em vários modelos de bactérias intracelulares, como *L. pneumophila* e *S. Typhimurium*, na ausência de caspase-1 ou GSDMD, ou na presença de uma caspase-1 inativa proteoliticamente em resposta à nigericina, a caspase-8 induz a morte celular (Lee et al., 2018; Mascarenhas et al., 2017; Van Opendenbosch et al., 2017; Schneider et al., 2017). Bioquimicamente, sugere-se que essa ativação ocorre por meio da interação entre o domínio ASC PYD e o domínio DED da caspase-8, ou através da molécula adaptadora FADD (Sagulenko et al., 2013; Vajjhala et al., 2015; Van Opendenbosch et al., 2017).

A caspase-8 parece ter um impacto no inflamassoma de NLRP3 em várias etapas, incluindo o *priming*, ativação e pós-montagem. Ela pode influenciar também a sinalização de NF- κ B, afetando positivamente a regulação de componentes chave do inflamassoma, como NLRP3 e pró-IL-1 β (Allam et al., 2014; Weng et al., 2014; Lemmers et al., 2007; Su et al., 2005). Além disso, a caspase-8 pode desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3 através do efluxo de K⁺, bem como em resposta a β -glucanos de *C. albicans* ligados a Dectina-1 (Ganesan et al. 2014). Esse efeito pode ocorrer por meio da interação da caspase-8 com ASC, utilizando seu domínio DED. Além disso, evidências em monócitos humanos sugerem que RIPK1-FADD-caspase-8 estão diretamente envolvidos na ativação de NLRP3 induzida por LPS-TLR4, independentemente do efluxo de K⁺ (Gaidt et al. 2016).

Além disso, a caspase-8 possui a capacidade de ativar tanto a caspase-1 quanto processar diretamente a pró-IL-1 β , independentemente da caspase-1 (Weng et al., 2014; Ganesan et al., 2014; Philip et al., 2014; Maelfait et al., 2008). Estudos mostraram que a

caspase-8 pode clivar a pró-IL-1 β no mesmo local que a caspase-1, quando células que superexpressam caspase-8 e pró-IL-1 β são tratadas com ligantes de TLR3 e TLR4. Isso sugere que caspase-8 desempenha um papel significativo na ativação e processamento da IL-1 β , contribuindo para a resposta inflamatória (Maelfait et al. 2008).

2. Justificativa

Nos últimos anos, houve avanços significativos no controle da brucelose em todo o mundo. No entanto, ainda existem regiões onde a infecção persiste em animais domésticos, resultando em transmissão frequente para a população humana. A brucelose continua sendo uma doença humana importante, muitas vezes não reconhecida e subnotificada em países do mediterrâneo europeu, norte e leste da África, Oriente Médio, Ásia central e sul, e América Central e do Sul (Corbel 2006). Além disso, no Brasil a brucelose bovina ainda é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária e indústria animal (Santos et al. 2013).

Em recente estudo do nosso grupo, foi demonstrado que a morte celular por piroptose, desencadeada pela *B. abortus*, dependente de Caspase-11/GSDMD, desempenha um papel importante na restrição da infecção *in vivo*. Esse mecanismo contribui para o recrutamento e ativação de células imunes, como os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Neste contexto, a caspase-8 tem sido objeto de intensa investigação, uma vez que tem sido implicada em vários processos inflamatórios, incluindo a sua capacidade de ativar diretamente a IL-1 β independentemente do inflamassoma. Além de seu papel tradicional na apoptose, caspase-8 também está envolvida na regulação da linfoproliferação, sugerindo uma função abrangente no controle da morte celular, inflamação e resposta imune (Feltham; Vince; Lawlor, 2017; Gurung; Kanneganti, 2015; Monie; Bryant, 2015; Tummers; Green, 2017). Estudos recentes também indicam que caspase-8 pode induzir a clivagem de GSDMD e desencadear a piroptose, como observado na inibição da via de NF- κ B por *Yersinia* (Orning et al., 2018; Sarhan et al., 2018).

Portanto, o objetivo deste estudo é investigar o envolvimento da caspase-8 e caspase-7 na resposta imune inata durante a infecção pela bactéria *Brucella abortus*, na ativação do inflamassoma, indução da piroptose e controle da infecção. Esperamos obter informações relevantes sobre os mecanismos envolvidos na resposta a esse patógeno, à medida que avançamos na compreensão dos processos moleculares da ativação das

caspses e do inflamassoma. Esses achados podem contribuir para a identificação de novos componentes do sistema imunológico envolvidos no controle da infecção pela bactéria *B. abortus*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da caspase-7 e caspase-8 no controle da infecção pela bactéria *Brucella abortus*

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o papel de caspase-7 e caspase-8 na secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e na ativação de caspase-1 em macrófagos em resposta a *B. abortus*.
- Investigar o papel de caspase-7 e caspase-8 na morte celular por piroptose em macrófagos em resposta a *B. abortus*.
- Avaliar o papel de caspase-7 e caspase-8 na susceptibilidade do hospedeiro murino frente a infecção por *B. abortus*;
- Avaliar o papel de caspase-8 na patologia induzida pela infecção pela *B. abortus*.

4. Material e métodos

4.1 Animais Experimentais

Camundongos wild-type (WT) C57BL/6 foram adquiridos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos *Casp7^{-/-}*, *Casp7/1/11^{-/-}*, *Casp7/Gsdmd^{-/-}*, *Gsdmd^{-/-}*, *Casp1/11^{-/-}* e *Casp8^{+/-}RIPK3^{-/-}* foram cedidos pelo Dr. Prof. Dario Simões Zamboni, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. Os camundongos foram criados no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB/UFMG. Todos os animais foram mantidos em biotério livre de patógenos, com ambiente controlado e livre acesso à alimento e água. Para realização de todos os experimentos foram utilizados grupos de 5 a 7 animais por grupo e utilizados com 6-9 semanas de idade. Os procedimentos para experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais - CEUA/UFMG sob o protocolo número 69/2020.

4.2 Bactéria e condições de cultivo

Foi utilizada bactéria da espécie *Brucella abortus*, cepa virulenta 2308. Para o estoque a bactéria foi crescida em meio BB (*Brucella Broth*) (BD Biosciences, EUA) por 72 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm, lavadas em PBS por 10 minutos, 4800 rpm a 4°C e ressuspendidas em 1 mL de PBS:glicerol na proporção de 9:1. Foram estocadas a -80°C, após quantificação, estavam prontas para uso. Para preparo do inóculo, a bactéria foi crescida em meio de cultura Brucella broth (BD Pharmigen, San Diego, CA) por 24 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. A densidade optica da cultura a 600nm foi medida em um espectrofotômetro para determinar o número de bactérias na solução.

4.3 Genotipagem de camundongos Caspase 8

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 o gene da caspase-8 com mutação (Casp8 2bpdelFw: GAAGCAGGAGACCATCGAATG; Casp8Rev: CCGCAGTCTCACAAGTCACT) e um par de iniciadores a ser usado como controle da presença de DNA nas amostras, o qual é capaz de amplificar o gene de caspase 8 do tipo selvagem (Casp8wtFw: GAAGCAGGAGACCATCGAGG; Casp8Rev: CCGCAGTCTCACAAGTCACT). Como controle geral de contaminação da reação, foi realizado PCR de uma amostra na ausência de DNA.

Tabela 1: Reação de PCR Touchdown

Programa de Touchdown PCR (Termociclador)

| Stage | Step | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|-------|----------------------|-------------|--------|--------|
| 1 | Desnaturação inicial | 95°C | 2 min | 1x |
| 2 | Desnaturação | 95°C | 30 seg | 12x |
| | Anelamento | 67° ↑ | 30 seg | |
| | Extensão | 72° | 30 seg | |
| 3 | Desnaturação | 95° C | 30 seg | 18 x |
| | Anelamento | 62° C | 30 seg | |
| | Extensão | 72° C | 30 seg | |
| 4 | Extensão Final | 72° C | 10 min | |
| 5 | | 4° C | ∞ | |

↑: Temperatura aumenta 0,5° C por ciclo a partir do segundo ciclo.

4.4 Infecção *in vivo*

Cinco a seis camundongos de cada grupo foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com uma solução de 100 µL de salina 0,9% NaCl contendo 1×10^6 UFCs de *B. abortus* da cepa virulenta S2308 e sacrificados 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).

4.5 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 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* em um MOI de 100 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 4h e estimuladas com 20 µM de nigericina (Sigma-Aldrich) por 30 min. Os sobrenadantes foram coletados e a citocina foram quantificadas utilizando kits de ELISA de IL-1β de camundongos (R & D systems, Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

Os BMDMs foram plaqueados em placas de 24 poços (5×10^5 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.

4.8 Western Blotting

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 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 suspendidas 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, Suia) 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 overnight com anticorpos primários a 4°C. Os anticorpos primários utilizados incluíram um anticorpo monoclonal de camundongo contra a subunidade p20 da caspase-1 (Adipogen, San Diego, CA, EUA) e um anticorpo monoclonal de coelho anti-GSDMD (ABcam) ambos em uma diluição de 1:1000. O controle da quantidade de proteínas foi realizado utilizando o anticorpo monoclonal de camundongos anti-β-actina (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).

4.9 Análise Histopatológica

Cada grupo de camundongos, composto por 5 a 6 animais das linhagens C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp8*^{-/-}/*RIPK3*^{-/-} foram submetidos a infecção intraperitoneal conforme descrito anteriormente. Após 2 semanas de infecção, os lobos mediais do fígado dos

camundongos foram coletados e fixados em uma solução de formaldeído tamponado a 10%. Em seguida, foram processados em parafina utilizando técnicas convencionais. Cortes histológicos com espessura de 5 μm foram corados com hematoxilina e eosina (HE). A contagem total de granulomas foi realizada de forma imparcial utilizando um microscópio Olympus CX31 (Tóquio, Japão) com uma objetiva de 20x. Imagens digitais de 15 granulomas por animal foram capturadas utilizando uma câmera Olympus SC30 (Tóquio, Japão). A área dos cortes histológicos e o tamanho dos granulomas foram calculados utilizando o software ImageJ Tool 3.0 (The University of Texas Health Science Center em San Antonio, San Antonio, TX).

4.10 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 secreção de IL-1 β em resposta a *Brucella abortus* ocorre de maneira independente da caspase-7

As caspases executoras clássicas (caspase-7 e -3) são ativadas para iniciar o processo que culmina nos sinais clássicos de morte celular (Nagata 2018). Estudos anteriores demonstram que a ativação da caspase-7 requer o processamento da caspase-1 em condições inflamatórias (Lamkanfi e Kanneganti 2010). Para investigar se a caspase-7 participa da clivagem da caspase-1 e secreção de IL-1 β durante a infecção por *Brucella abortus*, foram infectados BMDMs de C57BL/6 (WT), *Casp7*^{-/-}, *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-}. Após 17h de infecção, avaliamos a secreção de IL-1 β no sobrenadante das células (Figura 5A) e o lisado foi devidamente preparado para o ensaio de processamento da caspase-1 por análise de Western blot (Figura 5B). Em todos os ensaios, animais C57BL/6 e *Gsdmd*^{-/-} foram usados como controles, uma vez que a importância da gasdermina-D para a secreção de IL-1 β e para o controle da infecção por *B. abortus* já havia sido demonstrada anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Cerqueira et al. 2018). Observamos que BMDMs de camundongos *Casp7*^{-/-} secretam quantidades semelhantes de IL-1 β em comparação aos animais WT. No entanto, macrófagos de animais *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} apresentaram uma redução drástica na secreção de IL-1 β secretada em comparação com animais C57BL/6. A ativação da caspase-1 resulta em sua clivagem autoproteolítica em duas subunidades, p10 e p20, que são liberadas no meio extracelular (Thornberry et al. 1992). Nesta análise, a clivagem da caspase-1 foi observada apenas em animais C57BL/6 e *Casp7*^{-/-}, o que corrobora com o perfil de secreção da citocina IL-1 β . Com base nesses dados, podemos inferir que a caspase-7 não exerce um impacto significativo na secreção de IL-1 β e na clivagem da caspase-1 em resposta à infecção por *B. abortus*.

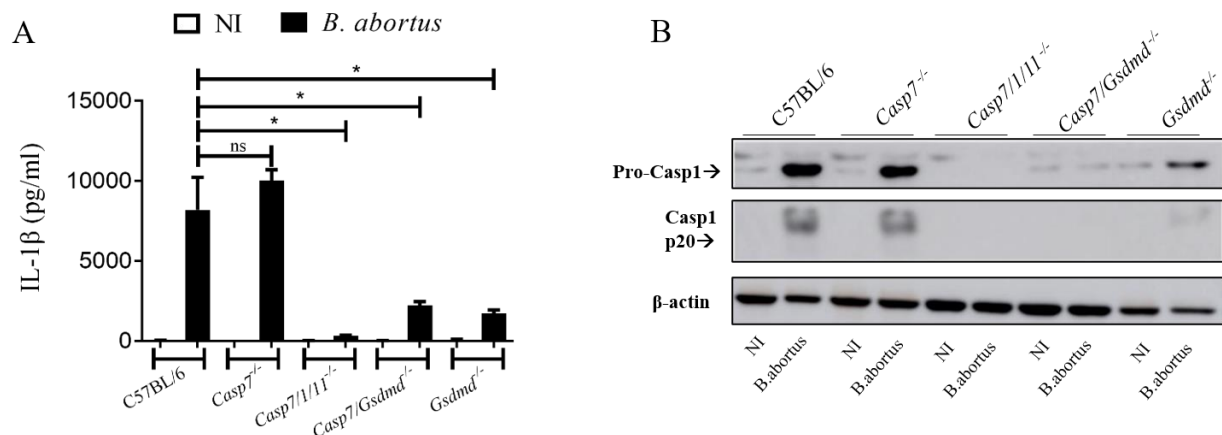


Figura 5: A produção de IL-1 β em resposta a *Brucella abortus* ocorre de maneira independente da caspase-7. BMDMs foram infectados com *B. abortus* MOI:100 por 17h. (A) Dosagem de IL-1 β no sobrenadante por ELISA. (B) Análise de Western blot do processamento da caspase-1 (presença da subunidade p20). O controle da quantidade de proteína entre as amostras foi utilizado através da reação com β -actina. Os dados mostram a média \pm desvio padrão de triplicatas. Os dados são representativos de três experimentos independentes. One-way ANOVA, * $p < 0,05$ em comparação com C57BL/6. NI: não infectado.

5.2 Caspase-7 não participa da piroptose de macrófagos durante a infecção por *Brucella abortus*

Em seguida, investigamos o envolvimento da caspase-7 na morte celular induzida por *B. abortus*, utilizando a quantificação da liberação de LDH nos sobrenadantes das culturas celulares (Figura 6). Para isso, infectamos BMDMs de camundongos das linhagens C57BL/6, *Casp7*^{-/-}, *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} com *B. abortus* e, após 8 horas de infecção, mensuramos a quantidade de LDH presente no sobrenadante. Observamos que a infecção por *B. abortus* resultou em maior liberação de LDH em BMDMs das linhagens C57BL6 e *Casp7*^{-/-}, em comparação com as células *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-}. A partir dos resultados obtidos, podemos

concluir que a caspase-7 não desempenha um papel significativo na indução da morte celular programada em resposta a infecção por *B. abortus*.

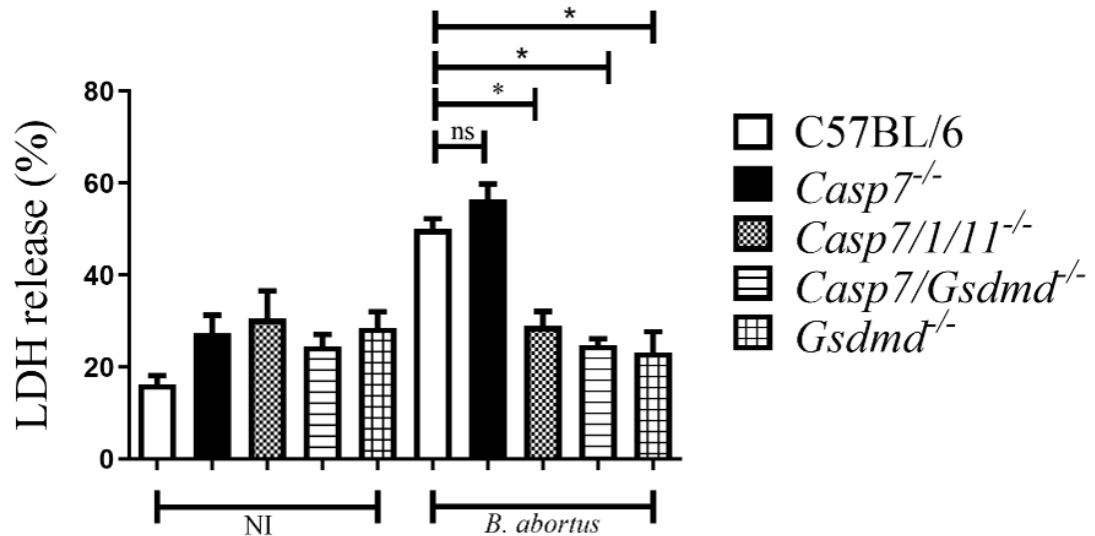


Figura 6: A caspase-7 não participa da piroptose de macrófagos durante a infecção por *B. abortus*. Os BMDMs foram infectados com *Brucella abortus* MOI: 100 por 8h e a quantificação de LDH foi realizada no sobrenadante celular. Os valores representam a porcentagem de LDH liberada em comparação com as células controle lisadas com Triton X-100. Os dados mostram a média \pm desvio padrão representativo de três experimentos independentes. One-way ANOVA, * $p < 0,05$ em comparação com C57BL/6. NI: não infectado.

5.3 A ausência de caspase-7 não influencia no controle da infecção *in vivo* por *Brucella abortus*

Para analisar se a ausência de caspase-7 influencia o controle da infecção por *Brucella in vivo*, realizamos uma infecção intraperitoneal em camundongos C57BL/6, Casp7^{-/-}, Casp7/1/11^{-/-}, Casp7/Gsdmd^{-/-} e Gsdmd^{-/-}. Após duas semanas, os animais foram sacrificados e os baços foram removidos para quantificação do número de unidades formadoras de colônias bacterianas (CFU). Conforme ilustrado na Figura 7, não

observamos diferenças na carga bacteriana entre os animais *Casp7*^{-/-} e os controles C57BL/6. No entanto, foram observados níveis mais elevados de bactérias nos camundongos *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-}. Esses resultados indicam que o perfil de suscetibilidade à infecção não foi afetado pela ausência de caspase-7, mas sim pela deleção de *Casp1/11* ou *Gsdmd*.

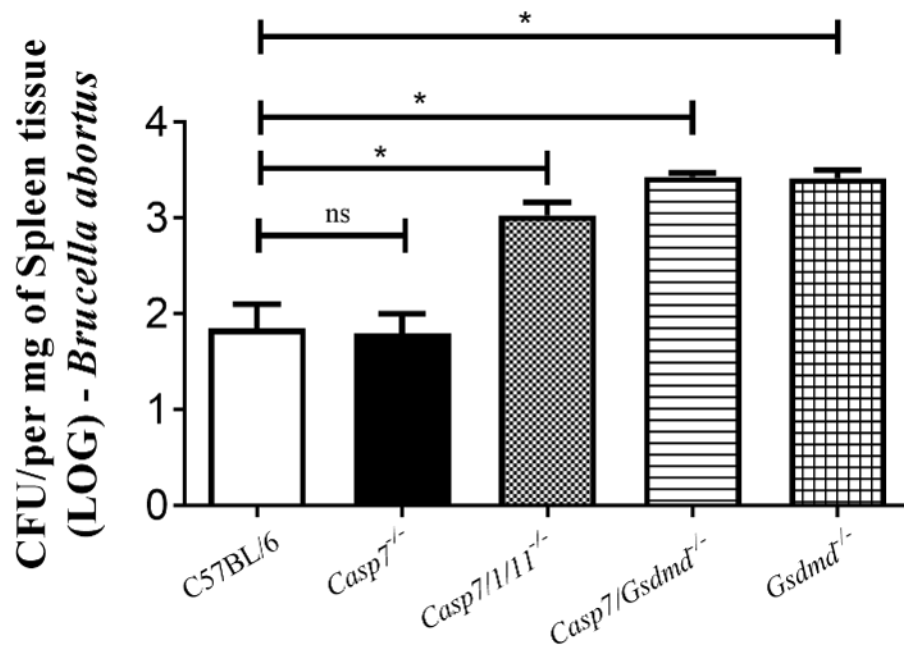


Figura 7: O papel da caspase-7 no controle da infecção por *Brucella abortus* in vivo. Camundongos foram infectados por via intraperitoneal com 1×10^6 CFU de *B. abortus* e sacrificados após 2 semanas de infecção. Os homogenatos do baço foram plaqueados em placas contendo meio BB para determinação do CFU. Os dados são representativos de três experimentos independentes. One-way ANOVA, * $p < 0,05$ em comparação com C57BL/6.

5.4 Genotipagem de camundongos Caspase-8

A fim de obter camundongos viáveis com deficiência em caspase-8, a estratégia utilizada envolve a deleção adicional de RIPK3 ou MLKL, uma vez que a perda de caspase-8

resulta em letalidade embrionária (Ammoun et al. 2012). A geração de camundongos deficientes para caspase-8 é realizada por meio do cruzamento entre animais heterozigotos ($Casp8^{+/-}RIPK3^{-/-}$). Como resultado desse cruzamento, a prole pode apresentar três diferentes fenótipos:

- $Casp8^{-/-}RIPK3^{-/-}$
- $Casp8^{+/-}RIPK3^{-/-}$
- $Casp8^{+/+}RIPK3^{-/-}$

Para garantir a distinção genética dos animais na prole, foi realizada a genotipagem. Como controles “positivos” e “negativos” para a reação de PCR, foram utilizadas amostras de DNA de animais sabidamente $Casp8^{-/-}RIPK3^{-/-}$ e $Casp8^{+/-}RIPK3^{-/-}$. O controle geral negativo da PCR consistiu no uso de água RNase/DNase Free em vez de DNA. Foram realizadas duas reações, denominadas “mix 1” e “mix 2”. O mix 1 avaliou a presença do alelo selvagem da caspase-8, enquanto o “mix 2” analisou a presença do alelo mutado. A presença de banda no mix 1 (parte superior do gel) indica a presença do alelo selvagem da caspase-8, enquanto a presença de uma banda no mix 2 (parte inferior do gel) indica a presença do alelo mutado de caspase-8. Em um experimento representativo (Fig. 8), observamos que 7 animais genotipados apresentaram bandas tanto no mix 1 quanto no mix 2 (colunas 2,4,5,6,8,9, e 10), sendo identificados como animais $Casp8^{+/-}RIPK3^{-/-}$; 3 animais apresentaram banda apenas no mix 2 (casp8 mutada) (colunas 1,3 e 7), sendo identificados como $Casp8^{-/-}RIPK3^{-/-}$ e nenhum animal apresentou banda somente no mix 1, que seriam denominados como $Casp8^{+/+}RIPK3^{-/-}$. Além disso, o controle negativo geral da reação (coluna 11) não apresentou banda com nenhum dos pares de iniciadores, conforme esperado.

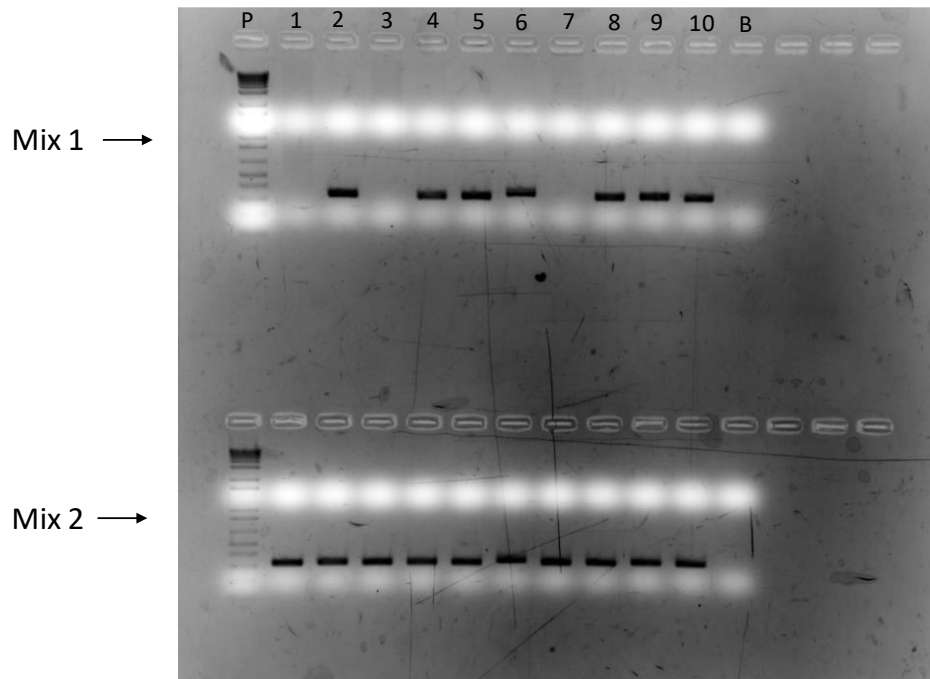


Figura 8: Gel de Agarose de genotipagem de animais Caspase 8. As biópsias de orelhas dos camundongos foram coletadas, tiveram seu DNA extraído e foram submetidas à reação de PCR (1-10). Como controle da reação (branco), foi utilizado água ao invés de DNA em uma das amostras. P: padrão; B: branco.

5.5 A caspase-8 participa da clivagem da caspase-1 e secreção de IL-1 β em resposta à *Brucella abortus*

Além disso, investigamos o papel da caspase-8 na regulação da resposta inflamatória durante a infecção por *B. abortus*. Para isso, utilizamos linhagens de células BMDMs de camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} e *Casp8*^{+/+}*RIPK3*^{-/-}. Os macrófagos foram infectados com *B. abortus* e, após 17 horas de infecção, avaliamos a secreção de IL-1 β no sobrenadante e realizamos análises de Western blot para verificar a clivagem da caspase-1. Observamos que BMDMs de *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} apresentaram uma redução significativa na secreção de IL-1 β em comparação com os controles WT e *Casp8*^{+/+}*RIPK3*^{-/-}, apresentando um perfil semelhante ao das células

Gsdmd^{-/-} (Figura 9A). Não detectamos a subunidade p20 da caspase-1 em sobrenadantes de macrófagos deficientes para caspase-8, indicando que a clivagem da caspase-1 depende da presença de caspase-8 (Figura 9B). Esses achados indicam um papel importante da caspase-8 na clivagem da caspase-1 e, conseqüente, na secreção de IL-1 β durante a infecção por *B. abortus*. Esses resultados sugerem que a caspase-8 possa desempenhar um papel crucial na resposta inflamatória induzida por essa infecção.

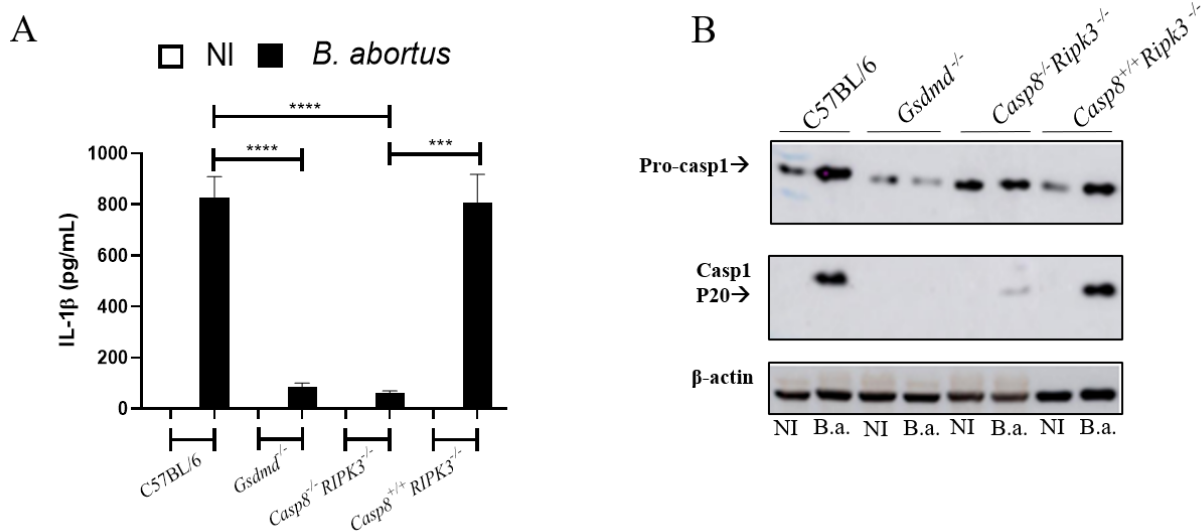


Figura 9: A caspase-8 participa da clivagem da caspase-1 e secreção de IL-1 β em resposta a infecção por *B. abortus*. BMDMs obtidos de camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} e *Casp8*^{+/+}*RIPK3*^{-/-} foram infectados ou não infectados com *B. abortus* S2308 MOI 100 por 17h. O sobrenadante foi coletado e submetido ao ensaio ELISA para estimar a concentração de IL-1 β (A). O sobrenadante foi marcado com anticorpo monoclonal anti-caspase-1 p20 (B). O controle da quantidade de proteína entre as amostras foi utilizado através da reação com β -actina. Os dados são representativos de três experimentos independentes. *Teste t* Student, **** $p < 0,0001$ em comparação com C57BL/6 ou *Casp8*^{+/+}*RIPK3*^{-/-}. *** $p < 0,001$

5.6 A ausência de caspase-8 interfere na morte celular induzida pela infecção por *Brucella abortus*

Nossos resultados fornecem evidências de que caspase-8 desempenha um papel importante na ativação do inflamassoma em resposta a infecção por *B. abortus*. Demonstramos que a clivagem da caspase-1 e a subsequente secreção de IL-1 β dependem da presença funcional da caspase-8. Além disso, investigamos o envolvimento da caspase-8 na piroptose induzida por *B. abortus*. Para isso, realizamos experimentos em macrófagos de camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp8*^{-/-} *RIPK3*^{-/-} infectados com *B. abortus* por um período de 8 horas. Avaliamos a liberação de LDH nos sobrenadantes celulares (Figura 10A) e analisamos a clivagem de GSDMD nos lisados celulares. Os resultados revelaram que a liberação de LDH foi significativamente reduzida em células provenientes de animais deficientes para caspase-8 e GSDMD. Além disso, observamos uma clivagem reduzida de GSDMD nos animais deficientes para caspase-8 (Figura 10B). Esses dados indicam que a caspase-8 desempenha um possível papel na indução da morte celular em resposta a *B. abortus*.

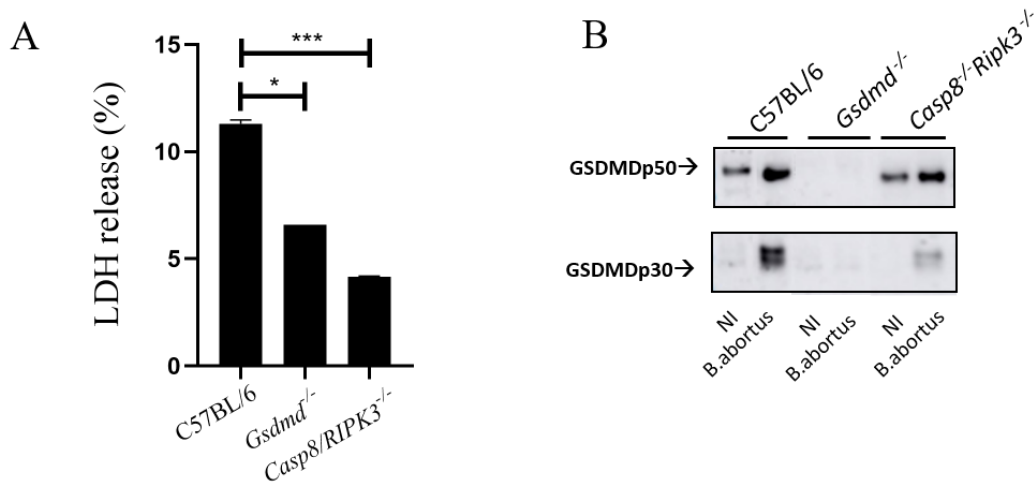


Figura 10: A caspase-8 é importante para induzir a morte celular durante a infecção por *B. abortus*. BMDMs C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp8*^{-/-} *RIPK3*^{-/-} foram infectados com *B. abortus* MOI 100, por 8h, a quantificação de LDH foi realizada no sobrenadante celular e

a análise da clivagem de GSDMD nos lisados celulares. Os valores representam a porcentagem de LDH liberada em comparação com as células controle lisadas com Triton X-100. Os dados mostram a média \pm desvio padrão representativo de três experimentos independentes. *Teste t Student*, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em comparação com C57BL/6.

5.7 Ausência de caspase-8 aumenta a suscetibilidade à infecção por *Brucella abortus in vivo*

Os nossos resultados obtidos em BMDMs deficientes em caspase-8 revelaram uma redução na ativação da caspase-1 e na secreção de IL-1 β . Com base nisso, buscamos investigar se a caspase-8 também desempenha um papel na restrição da infecção por *Brucella in vivo* em camundongos. Para isso, infectamos camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} por via intraperitoneal com *B. abortus*. Após 2 semanas de infecção, determinamos a quantidade de unidades formadoras de colônias bacterianas (CFU) nos homogenatos de baço. Observamos que a recuperação de bactérias no baço dos animais *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} foi maior em comparação com grupo controle WT, de forma semelhante ao observado nos animais *Gsdmd*^{-/-} (Figura 11). Esses resultados indicam que caspase-8 desempenha um papel crucial na resposta inflamatória e no controle da infecção por *B. abortus in vivo*.

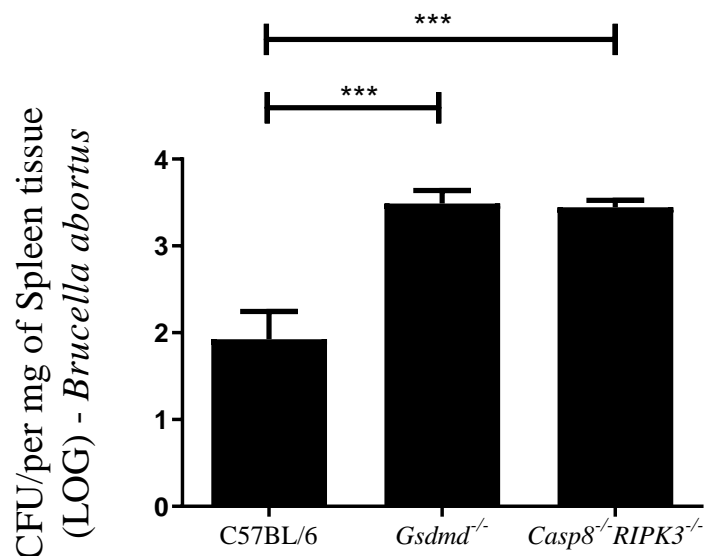


Figura 11: A caspase-8 influencia na resistência a infecção *in vivo* por *Brucella abortus*. Camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 de *B. abortus*. Os animais foram sacrificados após 2 semanas de infecção. Os homogenatos do baço foram plaqueados em placas contendo meio BB para determinação do CFU. Os dados apresentam a média \pm desvio padrão de cinco camundongos/grupo. Os dados são representativos de três experimentos independentes. One-way ANOVA, * $p < 0,001$ em comparação com C57BL/6.

5.8 Caspase-8 participa na formação de granulomas hepáticos durante a infecção por *B. abortus*

Na infecção por *Brucella abortus*, a formação de granulomas é uma resposta imunológica do hospedeiro para tentar controlar a infecção bacteriana. Essa resposta é importante para isolar as bactérias e limitar sua disseminação pelo organismo (Grillá et al. 2012). No entanto, o papel de caspase-8 na regulação da formação de granulomas durante a infecção por *Brucella* ainda não foi completamente compreendido. Para investigar esse aspecto, infectamos animais C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} por 2 semanas por via intraperitoneal. Amostras de tecido hepáticos foram coletadas, fixadas, parafinadas e corados com HE para análise histopatológica. Realizamos a contagem e medição dos tamanhos dos granulomas presentes nos tecidos.

Observamos que, em relação aos tamanhos dos granulomas, não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 12B). No entanto, de forma interessante, observamos que o número de granulomas foi muito menor no grupo dos animais *Casp8*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} em comparação aos animais controle C57BL/6 (Figura 12A). Esses achados sugerem que a ausência da caspase-8 pode comprometer a capacidade de formação de granulomas eficientes durante a infecção por *B. abortus*. Esses resultados são consistentes com os dados de susceptibilidade a infecção, indicando que animais deficientes para caspase-8 têm dificuldade em conter a infecção a nível tecidual, o que pode facilitar a disseminação sistêmica da *B. abortus*.

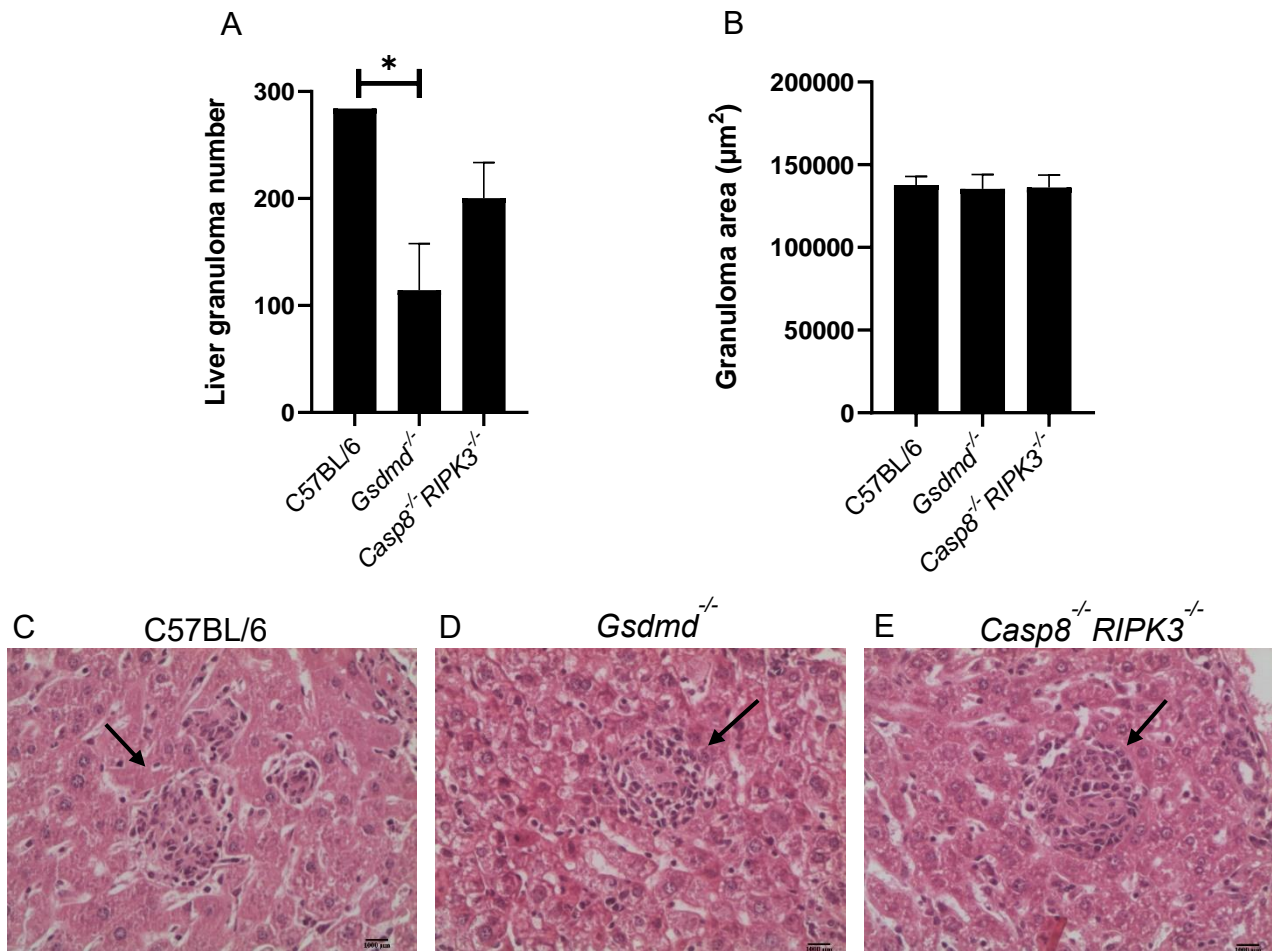


Figura 12: A caspase-8 participa na formação de granulomas hepáticos durante a infecção por *Brucella abortus*. Camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e *Casp8*^{-/-} *RIPK3*^{-/-} foram infectados por via intraperitoneal com 1×10^6 CFU de *B. abortus*. Os animais foram sacrificados após 2 semanas de infecção. Os fígados foram coletados e processados para a realização de análises histopatológicas. Os dados apresentam a média \pm desvio padrão de cinco camundongos/grupo. Os dados são representativos de três experimentos independentes. *Teste t* Student, * $p < 0,05$ em comparação com C57BL/6.

6. Discussão

As infecções bacterianas representam um desafio significativo para a saúde humana, causando uma ampla gama de doenças, desde infecções leves até condições potencialmente fatais. Durante a interação entre bactérias patogênicas e o hospedeiro, o sistema imunológico é ativado e desencadeia mecanismos de defesa para combater a infecção. Nesse contexto, a resposta inflamatória e a morte celular programada desempenham papéis importantes. Os inflamassomas desempenham um papel crucial na indução da morte celular programada, especificamente a piroptose e a apoptose. A caspase-1 e caspase-8, juntamente com seus substratos, são peças-chave nesses processos. A caspase-1 ativa vias de morte celular que podem depender ou não da proteína GSDMD (Kayagaki et al. 2015; Shi et al. 2015; Tsuchiya et al. 2019). Por outro lado, a caspase-8 é ativada pela formação de complexos moleculares, como as estruturas ASC, e induz a apoptose, de maneira independente da caspase-1. Quando os inflamassomas são ativados em resposta a infecção bacteriana, as células podem sucumbir a piroptose ou a apoptose, dependendo das vias de sinalização envolvidas. Essa redundância e robustez na morte celular programada associada aos inflamassomas desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos que manipulam os mecanismos de morte celular do hospedeiro.

As bactérias do gênero *Brucella* desenvolveram estratégias para inibir a morte celular em macrófagos, que são células cruciais no processo de infecção. Esses microrganismos expressam proteínas e fatores de virulência que interferem na sinalização das caspases, inibindo a apoptose que normalmente ocorreria como parte da resposta imunológica do hospedeiro. Um exemplo disso é a proteína BspJ (*Brucella* nucleomodulin protein), secretada por *B. abortus*, que atua como um inibidor do apoptose (Ma et al. 2020). Durante a infecção por *Brucella*, observou-se uma resistência a apoptose mediada por ligantes como Fas ou interferon- γ (IFN- γ), indicando que a bactéria é capaz de proteger as células hospedeiras contra processos pró-apoptóticos exógenos que ocorrem em diferentes estágios da resposta imune. Além disso, monócitos humanos infectados demonstram uma superexpressão do gene A1, que pertence à família Bcl-2 e está

relacionado a sobrevivência celular pela via intrínseca (Gross et al. 2000). Análises transcriptômicas de macrófagos infectados por *Brucella* revelaram a regulação de vários genes do hospedeiro envolvidos no apoptose e no ciclo celular, embora não haja um padrão direto observado (Rajashekara et al. 2006), como a inibição da liberação de citocromo c e a produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias, sugerindo a inibição da cascata de caspases (He et al. 2006). A ocorrência de morte celular por apoptose em macrófagos RAW264.7 é observada apenas durante infecções com cepas rugosas de *Brucella*, como RB51 e RA1, em comparação com a cepa virulenta de *B. abortus* 2308 (Chen e He 2009). Por outro lado, as cepas lisas da *Brucella* demonstram habilidade em controlar ou influenciar as funções mitocondriais, evitando a morte celular por meio da inibição da transição da membrana mitocondrial e da liberação de citocromo c, o que permite sua sobrevivência e replicação dentro dos macrófagos. Em contraste, as cepas rugosas de *Brucella* induzem a morte celular através da liberação de citocromo c da mitocôndria. Isso demonstra que o antígeno O do LPS das cepas lisas de *Brucella* atua como um fator importante na inibição da morte celular, visando a sua própria sobrevivência dentro das células hospedeiras (Chen e He 2009).

A gasdermina-D, é considerada um mediador crítico da piroptose. A caspase-1 é responsável por ativar proteoliticamente GSDMD, que por sua vez forma poros na membrana plasmática da célula, levando ao influxo de água, inchaço celular e, por fim, lise celular (Fink e Cookson 2006; Lieberman, Wu, e Kagan 2019; Liu et al. 2016). Em estudos realizados pelo nosso grupo, observou-se que *B. abortus* estimula a ativação do inflamassoma não canônico de uma maneira dependente de proteínas de ligação ao guanilato (GBPs). Nossos achados mostraram a participação da caspase-11 e da GSDMD nesse processo, enquanto o NLRP3 e a caspase-1 não estão envolvidos (Cerqueira et al. 2018). Esses resultados ressaltam o papel importante da piroptose na defesa do hospedeiro contra a infecção por *B. abortus*, evidenciando a relevância desse mecanismo na resposta imunológica contra esse patógeno. Além disso, tanto a caspase-1 quanto a caspase-8 compartilham diversas semelhanças funcionais, apesar de suas diferenças estruturais. Ambas podem ser ativadas pela formação de complexos proteicos, como a molécula ASC, e desempenham um papel na indução de piroptose e

apoptose. Elas também são capazes de ativar proteoliticamente diversos substratos em comum, incluindo GSDMD, caspase-7, IL-1 β e IL-18 (Malik e Kanneganti 2017; Orning et al. 2018; Sarhan et al. 2018; Tsuchiya e Hara 2014). Embora as caspases 4,5 e 11 possuam homologias de sequência mais altas com a caspase-1 do que com a caspase-8, elas não são ativadas em inflamassomas canônicos, não ativam diretamente IL-1 β e IL-18, e não parecem induzir morte celular independente de GSDMD (Hara et al. 2018). No entanto, o papel da caspase-8 durante a infecção por *B. abortus* ainda não era conhecido. Portanto, neste estudo, nosso objetivo foi investigar se caspase-8 e seu substrato, a caspase-7, desempenham um papel na ativação do inflamassoma e na indução de morte celular durante a infecção por *B. abortus*.

A necroptose é outro tipo de morte celular programada que possui características inflamatórias e envolve as quinases RIPK1 e RIPK3, assim como a pseudoquinase formadora de poros MLKL. Durante a necroptose, a fosforilação de RIPK3 resulta na oligomerização de MLKL, que se insere na membrana plasmática da célula, formando poros e levando à ruptura celular (Tummers e Green 2017). No entanto, é importante ressaltar que, neste estudo, estamos focando na investigação dos mecanismos de morte celular por apoptose e piroptose, os quais estão associados a ativação da caspase-8. Quando a caspase-8 é inibida, a interação entre RIPK1 e RIPK3 é favorecida, resultando na indução da necroptose (Nagakannan Pandian 2022). No entanto, utilizamos animais com deleção dupla para caspase-8 e RIPK3, o que bloqueia especificamente a via da necroptose (Kaiser et al. 2011).

A caspase-7, assim como a caspase-3, é uma caspase executora que é ativada sob certas condições pelas caspases-8 e -9 durante a apoptose induzida pelo receptor de morte (Lamkanfi et al. 2002). Estudos recentes têm demonstrado que a caspase-7 desempenha um papel distinto da caspase-3 na ativação da apoptose e também está envolvida na resposta inflamatória contra patógenos bacterianos (Slee et al. 2001). Experimentos utilizando a infecção por *Salmonella typhimurium* em macrófagos ou células estimuladas com LPS e ATP mostraram que a ativação da caspase-7 dependia da caspase-1. Além disso, foi observado que ausência de caspase-7 prejudicou a

capacidade dos macrófagos em restringir a replicação intracelular de *Legionella pneumophila* (Akhter et al. 2009). No entanto, em nosso estudo, a caspase-7 não parece desempenhar um papel significativo na resposta imune durante a infecção por *B. abortus*. A ativação do inflamassoma, avaliada pela clivagem da caspase-1, não foi afetada na ausência da caspase-7, pois a clivagem dessa caspase ocorreu tanto nas linhagens de macrófagos deficientes para caspase-7 quanto nas células controle de animais C57BL/6. A clivagem da caspase-1 também foi reduzida nas células dos animais *Casp7/1/11^{-/-}*, *Casp7/Gsdmd^{-/-}* e *Gsdmd^{-/-}*, assim como a secreção de IL-1 β . Apesar da caspase-7 possuir alguma capacidade de clivar a caspase-1 em certas condições experimentais, nossos resultados demonstraram que ela geralmente não é essencial para a clivagem da caspase-1 e ativação do inflamassoma. Em nossos experimentos, observamos que na ausência da caspase-7, outras caspases foram capazes de compensar sua ausência e permitir a clivagem e ativação de caspase-1. Isso indica que a caspase-7 não é crucial para a ativação do inflamassoma e sugere que outras vias de sinalização podem estar envolvidas na clivagem da caspase-1 na ausência da caspase-7. Apesar de estudos anteriores com *L. pneumophila* (Gonçalves et al. 2019) mostrarem que a caspase-7 desempenha um papel na formação de poros e na promoção da morte celular, nossos resultados indicaram que, durante a infecção por *B. abortus*, a caspase-7 não desempenha um papel importante na piroptose induzida pela infecção. A quantificação de LDH nos sobrenadantes das células de animais *Casp7^{-/-}* infectadas revelou níveis semelhantes aos observados no grupo controle WT, sugerindo que a caspase-7 não está envolvida neste processo. Até o momento, nossos resultados demonstraram que a resposta imunológica em animais deficientes em caspase-7 se assemelha ao observado nos animais controle C57BL/6. Além disso, ao investigar a susceptibilidade a infecção *in vivo*, observamos que a ausência de caspase-7 não afeta a capacidade de defesa do organismo contra o patógeno. O perfil de susceptibilidade observado nos animais *Casp7/1/11^{-/-}*, *Casp7/Gsdmd^{-/-}* e *Gsdmd^{-/-}* é atribuído à deleção adicional das moléculas caspase-1, caspase-11 e GSDMD. Essas proteínas desempenham um papel importante na resposta imunológica durante a infecção por *B. abortus*, conforme descrito em um estudo anterior conduzido por nosso grupo de pesquisa (Cerqueira et al. 2018).

A caspase-8 é uma proteína efetora multifuncional que desempenha diferentes funções dependendo do estímulo recebido pela célula. Em estudos de infecção por *Salmonella*, foi observado que a caspase-8 é recrutada para o inflamassoma NLRC4, regulando a secreção de IL-1 β (Man et al. 2013). No contexto da infecção por *Brucella abortus*, nossos resultados mostraram que a ausência de caspase-8 não afeta a expressão da pró-caspase-1, mas tem um impacto negativo na clivagem da pró-caspase-1 em sua subunidade ativa p20. Para investigar se a deleção de RIPK3 também influenciava a resposta imune em animais com dupla deleção, utilizamos animais Casp8^{+/+}RIPK3^{-/-} em nossos estudos. Positivamente constatamos que a deleção de RIPK3 não exerceu nenhum efeito na clivagem de caspase-1. O perfil de clivagem dessa proteína foi semelhante ao observado nos animais controle C57BL/6. Portanto, podemos concluir que o comprometimento na clivagem da caspase-1 nos animais com dupla deleção para caspase-8 e RIPK3 é devido à ausência de caspase-8.

A citocina IL-1 β não possui uma sequência de sinalização para secreção convencional e é liberada das células por mecanismos não convencionais. Estudos tem demonstrado que os poros formados por GSDMD são suficientes para mediar a liberação de IL-1 β em células em processo de piroptose (Heilig et al. 2018). Em nossos estudos utilizando células de animais Casp8^{-/-}RIPK3^{-/-}, observamos uma redução na secreção de IL-1 β . Acreditamos que isso ocorra devido a clivagem reduzida da caspase-1 em sua subunidade ativa p20 e, conseqüentemente, a diminuição na produção de IL-1 β . Esses resultados são consistentes com estudos anteriores realizados em macrófagos infectados com *Salmonella Typhimurium*, nos quais a dosagem de pró-IL-1 β e IL-1 β foram significativamente reduzidas em BMDMs de Casp8^{-/-}RIPK3^{-/-} em comparação com os controles correspondentes (Man et al. 2013).

Em nosso estudo, analisamos a morte celular utilizando o ensaio de liberação de LDH e observamos que a piroptose induzida por *B. abortus* é influenciada pela caspase-8. Embora se acredite que a caspase-8 processe a GSDMD em sua forma ativa, estudos demonstraram que ela é menos eficiente nessa clivagem em comparação com a caspase-1 (Orning et al. 2018; Rogers et al. 2017; Taabazuing, Okondo, e Bachovchin

2017). Nossa hipótese é que, com uma menor concentração de caspase-1 ativa disponível nos animais deficientes em caspase-8, isso possa prejudicar a clivagem de GSDMD, e conseqüentemente, a piroptose mediada por caspase-1. Em um estudo realizado utilizando um modelo de infecção com *Yersinia*, caspase-8 demonstrou um papel importante na ativação de GSDMD e na indução da morte celular piroptótica (Sarhan et al. 2018), corroborando com o nosso modelo de infecção com *Brucella*, onde observamos que a clivagem de GSDMD também foi comprometida nos animais deficientes em caspase 8. É importante destacar que a piroptose desempenha um papel crucial na restrição da infecção por *B. abortus in vivo*. Em animais deficientes para GSDMD, a ausência de piroptose mediada pela GSDMD está diretamente relacionada a um menor recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas devido a redução da secreção de citocinas e quimiocinas (Cerqueira et al. 2018). Vários estudos tem identificado funções celulares associadas ao poro mediado por GSDMD, incluindo a secreção de moléculas como IL-1 β , IL-1 α e eicosanoides, que desempenham um papel importante no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e promover a fagocitose das células infectadas contribuindo para a restrição da infecção (Jorgensen et al. 2016). No presente estudo, observamos uma redução na secreção de IL-1 β e uma menor indução de piroptose em camundongos *Casp8^{-/-}RIPK3^{-/-}*, o que resultou em uma maior suscetibilidade à infecção *in vivo*. Estes dados corroboram com dados anteriores, onde uma maior susceptibilidade a infecção por *B. abortus* foi parcialmente atribuída a produção reduzida de IL-1 β e possivelmente de IL-18 e/ou outros processos dependentes de caspase-1 (Gomes et al. 2013). Estudos recentes também destacaram o papel crucial de caspase-8 na ceratite causada por *Aspergillus fumigatus*, demonstrando sua importância no recrutamento de células inflamatórias e na eliminação do fungo (Wang et al., 2022). Embora não tenhamos investigado diretamente o recrutamento celular neste estudo, especulamos que a redução da piroptose em animais deficientes em caspase-8 possa comprometer o recrutamento adequado de células imunes para o local da infecção, contribuindo assim para o aumento da carga bacteriana observada nesses animais.

A formação de granulomas é uma resposta importante do sistema imunológico durante a infecção por *B. abortus*, contribuindo para controlar a disseminação da bactéria pelo

organismo (Grillá et al. 2012). Estudos anteriores utilizando o modelo de infecção com *Mycobacterium marinum* avaliando o efeito do medicamento *Imatinibe* (medicamento contra câncer), demonstraram que a caspase-8 desempenha um papel na regulação da sobrevivência celular inibindo a apoptose, e na modulação da resposta inflamatória, contribuindo para a redução do crescimento do granuloma e na limitação da inflamação *in vivo* (Cleverley et al. 2023). No presente trabalho, observamos que os granulomas formados durante a infecção por *B. abortus* nas linhagens estudadas mantiveram um tamanho semelhante entre os grupos, sem grandes diferenças. No entanto, notamos que os animais deficientes em caspase-8 apresentaram uma dificuldade em conter a infecção por *Brucella* a nível tecidual, evidenciada pelo número significativamente menor de granulomas no tecido hepático destes animais em comparação com os animais controle C57BL/6, sugerindo que caspase-8 possa desempenhar um papel na resposta imune e na formação adequada dos granulomas durante a infecção pela *B abortus*.

Coletivamente, nossos resultados indicam claramente a importância de caspase-8 na clivagem da caspase-1 e na secreção de IL-1 β . A ausência dessas proteínas tem um impacto negativo no processo da piroptose, o que afeta significativamente a resposta imunológica e o controle da infecção. Conseqüentemente, a ausência da caspase-8 torna os animais mais susceptíveis a infecção *B. abortus*. Esses achados reforçam a relevância da caspase-8 na resposta imunológica contra *B. abortus*, destacando seu papel fundamental na ativação da piroptose e na regulação da inflamação durante a infecção.

7. Conclusão

A brucelose é uma doença zoonótica amplamente disseminada em todo o mundo e, apesar de sua prevalência, é considerada uma das doenças mais negligenciadas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Essa condição causa significativos impactos econômicos e representa um sério problema de saúde pública. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica durante a infecção por *B. abortus*. Essas descobertas auxiliam no desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle mais eficazes, visando reduzir o impacto dessa doença na saúde humana e animal.

A via de sinalização desencadeada durante a infecção por *Brucella abortus* resulta em alguns desdobramentos dependendo do contexto da infecção. Em condições normais, resumidamente, a infecção leva a ativação de inflamassomas, levando a ativação de caspase-1 e, conseqüentemente, secreção de IL-1 β e indução de piroptose mediado por GSDMD (Cerqueira et al. 2018). Este mecanismo é importante para o controle da infecção bacteriana, e se mostram os principais efetores dessa via de morte celular. Neste estudo, observamos que a clivagem de caspase-1 e secreção de IL-1 β durante a infecção por *B. abortus* em animais deficientes em caspase-8 apresentou-se de forma deficiente, contribuindo para uma menor indução de piroptose, tornando os animais Casp8^{-/-}RIPK3^{-/-} mais susceptíveis a infecção. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo fornecem informações relevantes para entender o papel de caspase-8 durante a infecção pela *Brucella* e como essa molécula pode contribuir para a proteção do hospedeiro contra patógenos como a *B. abortus*.

8. Referências

- Aglietti, Robin A., Alberto Estevez, Aaron Gupta, Monica Gonzalez Ramirez, Peter S. Liu, Nobuhiko Kayagaki, Claudio Ciferri, Vishva M. Dixit, e Erin C. Dueber. 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(28). doi: 10.1073/pnas.1607769113.
- Akhter, Anwari, Mikhail A. Gavrilin, Laura Frantz, Songcerae Washington, Cameron Ditty, Dominique Limoli, Colby Day, Anasuya Sarkar, Christie Newland, Jonathan Butchar, Clay B. Marsh, Mark D. Wewers, Susheela Tridandapani, Thirumala Devi Kanneganti, e Amal O. Amer. 2009. "Caspase-7 activation by the nlr4/ipaf inflammasome restricts legionella pneumophila infection". *PLoS Pathogens* 5(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1000361.
- Albiger, B., S. Dahlberg, B. Henriques-Normark, e S. Normark. 2007. "Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: Focus on the Toll-like receptors". *Journal of Internal Medicine* 261(6).
- Alexander, B., P. R. Schnurrenberger, e R. R. Brown. 1981. "Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows." *The Veterinary record* 108(23). doi: 10.1136/vr.108.23.500.
- Allam, Ramanjaneyulu, Kate E. Lawlor, Eric Chi-Wang Yu, Alison L. Mildenhall, Donia M. Moujalled, Rowena S. Lewis, Francine Ke, Kylie D. Mason, Michael J. White, Katryn J. Stacey, Andreas Strasser, Lorraine A. O'Reilly, Warren Alexander, Benjamin T. Kile, David L. Vaux, e James E. Vince. 2014. "Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP 3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming". *EMBO reports* 15(9). doi: 10.15252/embr.201438463.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, e J. Yuan. 1996. "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* 87(2).
- Alvarez-Diaz, Silvia, Christopher P. Dillon, Najoua Lalaoui, Maria C. Tanzer, Diego A. Rodriguez, Ann Lin, Marion Lebois, Razq Hakem, Emma C. Josefsson, Lorraine A. O'Reilly, John Silke, Warren S. Alexander, Douglas R. Green, e Andreas Strasser. 2016. "The Pseudokinase MLKL and the Kinase RIPK3 Have Distinct Roles in Autoimmune Disease Caused by Loss of Death-Receptor-Induced Apoptosis". *Immunity* 45(3). doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.016.
- Ammoun, S., M. C. Schmid, N. Ristic, L. Zhou, D. Hilton, E. Ercolano, C. Carroll, C. O. Hanemann, F. Antohe, L. N. Dobrila, C. Heltianu, S. Azadi, Y. Zhang, A. R. Caffè, B. Holmqvist, T. van Veen, S. Bandoh, J. Fujita, Y. Ohtsuki, Y. Ueda, S. Hojo, M. Tokuda, H. Dobashi, N. Kurata, T. Yoshinouchi, N. Kohno, J. Takahara, K. Bauermeister, M. Burger, N. Almanasreh, H. P. Knopf, R. R. Schumann, P. Schollmeyer, G. J. Dobos, K. Bauermeister, H. P. Knopf, P. Schollmeyer, G. J. Dobos, H. Chen, L. Mei, L. Zhou, X. Zhang, C. Guo, J. Q. Li, Huayi Wang, Y. Zhu, Y. Zheng, L. Huang, S. K. Chintala, X. Zhang, J. S. Austin, M. E. Fini, H. Y. Cho, E. K. Choi, S. W. Lee, K. O. Jung, S. K. Seo, I. W. Choi, S. G. W. J. Park, I. W. Choi, R. B. Dinn, M. B. Zimmerman, L. M. Shuba, A. P. Doan, M. K. Maley, E. C. Greenlee, W. L. Alward, Y. H. Kwon, M. K. G. Do, Y. Sato, N. Shimizu, T. Suzuki, J. Shono, W. Mizunoya, M. Nakamura, Y. Ikeuchi, J. E. Anderson, R. Tatsumi, J. M. Doannio, J. Dossou-Yovo, S. Diarrassouba, G. Chauvancy, F. Darriet, F. Chandre, M. C. Henry, I. Nzeyimana, P. Guillet, P. Carnevale, N. Doba, T. Kushiro, M. Yamashita, T. Kitagawa, M. Nasu, S. Saito, S. Hiramatsu, S. Hinohara, R. Dobhan, D. O. Castell, B. H. Dobkin, A. Firestine, M. West, K. Saremi, R. Woods, A. Doble, D. Girdlestone, O. Piot, D. Allam, J. Betschart, A. Boireau, A. Dupuy, C. Gueremy, J. Menager, J. L. Zundel, et al., S. v Dobritsa, I. T. Kuok, H. Nguyen, J. C. Webster, A. M. Spragg, T. Morley, G. J. Carr, J.

Dossou-Yovo, S. Diarrassouba, J. M. Doannio, F. Darriet, P. Carnevale, L. Drew, R. L. Fine, T. N. Do, G. P. Douglas, D. P. Petrylak, N. Festjens, Tom vanden Berghe, S. Cornelis, Peter Vandenabeele, M. Fujimura, Y. Gasche, Y. Morita-Fujimura, J. Massengale, M. Kawase, P. H. Chan, J. Fujita, N. Dobashi, M. Tokuda, S. Bandoh, Y. Ohtsuki, I. Yamadori, T. Yoshinouchi, Y. Ueda, J. Takahara, Yonghui Yang, Y. Fukunaga, S. Hojo, Y. Ueda, N. Dobashi, K. Dohmoto, T. Ishida, J. Takahara, Y. Gasche, M. Fujimura, Y. Morita-Fujimura, J. C. Copin, M. Kawase, J. Massengale, P. H. Chan, P. Geserick, M. Hupe, M. Moulin, W. W. Wong, M. Feoktistova, B. Kellert, H. Gollnick, J. Silke, M. Leverkus, L. Guo, S. E. Moss, R. A. Alexander, R. R. Ali, F. W. Fitzke, M. F. Cordeiro, Sudan He, Lai Li Feng Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, Xiaodong Wang, S. Q. Hu, J. S. Ye, Y. Y. Zong, C. C. Sun, D. H. Liu, Y. P. Wu, T. Song, G. Y. Zhang, I. K. Hwang, Y. S. Yoon, J. H. Choi, K. Y. Yoo, S. S. Yi, D. W. Chung, H. J. Kim, C. S. Kim, S. G. Do, J. K. Seong, I. S. Lee, M. H. Won, K. Kalli, H. L. Dobb, D. J. Webb, K. Carroll, M. Komodromos, C. Themistos, G. D. Peng, Q. Fang, I. W. Boyd, S. H. J. Kang, E. Y. Lee, J. M. K. Song, K. H. Do, J. B. Seo, T. H. Lim, J. M. K. Song, D. H. Kang, Y. H. Kim, C. W. Lee, M. K. Hong, S. G. W. J. Park, S. G. W. J. Park, T. H. Kim, S. H. J. Kang, C. Doe, J. Yu, J. B. Sim, J. Kim, S. R. Kline, S. M. Choi, J. S. Knyrim, H. Emme, M. Doblinger, O. Oeckler, M. Weil, H. Huppertz, N. G. Koretskaia, O. I. Loseva, V. N. Gerasimov, S. D. Priamchuk, O. E. Svetoch, A. P. Dobritsa, M. Lagerlund, H. G. Dixon, J. A. Simpson, M. Spittal, H. R. Taylor, S. J. Dobbins, R. W. Laird, F. G. Kondev, M. A. Riley, D. E. Archer, T. B. Brown, R. M. Clark, M. Devlin, P. Fallon, D. P. J. Hartley, I. M. Hibbert, D. T. Joss, D. R. LaFosse, P. J. Nolan, N. J. O'Brien, E. S. Paul, J. Pfohl, D. G. Sarantites, R. K. Sheline, S. L. Shepherd, J. A. Simpson, R. Wadsworth, M. T. Matev, A. v Afanasjev, J. Dobaczewski, G. A. Lalazissis, W. Nazarewicz, W. Satula, R. Lauche, H. Cramer, K. E. Choi, T. Rampp, F. J. Saha, G. J. Dobos, F. Musial, C. Hohmann, K. E. Choi, T. Rampp, F. J. Saha, F. Musial, J. Langhorst, G. J. Dobos, T. G. Le, L. Ngo, S. Mehta, V. D. Do, T. Q. Thach, X. D. Vu, D. T. Nguyen, A. Cohen, B. Lemmers, L. Salmena, N. Bidere, H. Su, E. Matysiak-Zablocki, K. Murakami, P. S. Ohashi, A. Jurisicova, M. Lenardo, R. Hakem, A. Hakem, J. Q. Li, J. J. Wang, Q. Peng, C. Chen, M. B. Humphrey, J. Heinecke, S. X. Zhang, W. Li, X. Jin, Y. Zhou, M. Zhu, X. Lin, X. Hu, W. Wang, Fu Sheng Wang, G. Jin, L. You, J. Cooper, G. Schiavon, A. Pepe-Caprio, L. Zhou, R. Ishii, M. Giovannini, C. O. Hanemann, S. B. Long, H. Erdjument-Bromage, P. Zhou, P. Tempst, F. G. Giancotti, B. Lian, C. Xu, A. Cheng, M. Wang, De e. Zhu, Q. Luo, R. Jia, F. Bi, Z. Chen, Y. Zhou, Z. Yang, X. Chen, R. Liang, J. Liu, S. Manabe, Z. Gu, S. A. Lipton, N. Mathalone, N. Lahat, M. A. Rahat, K. Bahar-Shany, Y. Oron, O. Geyer, M. P. Mattson, S. Camandola, E. D. Nelson, H. Do, R. S. Lewis, S. A. Carr, V. J. Obremski, A. M. Hall, C. Fernandez-Valle, Q. Remijsen, V. Goossens, S. Grootjans, C. van den Haute, N. Vanlangenakker, Y. Dondelinger, R. Roelandt, I. Bruggeman, A. Goncalves, M. J. Bertrand, V. Baekelandt, N. Takahashi, T v Berghe, Peter Vandenabeele, A. M. Romanic, R. F. White, A. J. Arleth, E. H. Ohlstein, F. C. Barone, C. Sanchez-Ramos, J. A. Vega, M. E. del Valle, A. Fernandez-Balbuena, C. Bonnin-Arias, J. M. Benitez-del Castillo, A. R. Santos, R. G. Corredor, B. A. Obeso, E. F. Trakhtenberg, Y. Wang, J. Ponmattam, G. Dvorianchikova, D. Ivanov, V. I. Shestopalov, J. L. Goldberg, M. E. Fini, M. L. Bajenaru, P. v Sarthy, M. Fu, C. Scaffidi, I. Schmitz, P. H. Krammer, M. E. Peter, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer, M. E. Peter, F. A. Scheer, A. D. Michelson, A. L. Frelinger 3rd, H. Evoniuk, E. E. Kelly, M. McCarthy, L. A. Doamekpor, M. R. Barnard, S. A. Shea, S. J. Sedlmaier, M. Doblinger, O. Oeckler, J. Weber, J. S. auf der Gunne, W. Schnick, L. Seethalakshmi, S. P. Mitra, P. R. Dobner, M. Menon, R. E. Carraway, S. D. Seiwert, S. W. Andrews, Y. Jiang, V. Serebryany, H. Tan, K. Kossen, P. T. Rajagopalan, S. Misialek, S. K. Stevens, A. Stoycheva, J. Hong, S. R. Lim, X. Qin, R. Rieger, K. R. Condroski, H. Zhang, M. K. G. Do, C. Lemieux, G. P. Hingorani, D. P. J. Hartley, J. A. Josey, L. Pan, L. Beigelman, L. M. Blatt,

- Y. Sonoda, Y. Matsumoto, M. Funakoshi, D. Yamamoto, S. K. Hanks, T. Kasahara, S. Sakurai, M. Hasegawa, E. Aizu-Yokota, T. Momoi, T. Kasahara, W. Sun, P. Qin, H. Gao, G. Li, K. Jiao, M. Sylla, L. Konan, J. M. Doannio, S. Traore, M. P. Terra, R. G. Beets-Tan, I. Vervoorn, M. Deutekom, M. N. Wasser, T. D. Witkamp, A. C. Dobben, C. G. Baeten, P. M. Bossuyt, J. Stoker, B. A. Tucker, M. Rahimtula, K. M. Mearow, N. Vanlangenakker, M. J. Bertrand, P. Bogaert, Peter Vandenabeele, Tom vanden Berghe, E. Vecino, J. P. Heller, P. Veiga-Crespo, K. R. Martin, J. W. Fawcett, D. Vercammen, R. Beyaert, G. Denecker, V. Goossens, G. van Loo, W. Declercq, J. Grooten, W. Fiers, Peter Vandenabeele, C. Votino, M. Cannie, V. Segers, O. Dobrescu, H. Dessy, V. Gallo, T. Cos, N. Damry, J. Jani, T. Wachter, M. Sprick, D. Hausmann, A. Kerstan, K. McPherson, G. Stassi, E. B. Brocker, H. Walczak, M. Leverkus, Zhigao Y. Wang, H. Jiang, She Chen, F. Du, Xiaodong Wang, P. S. Welz, A. Wullaert, K. Vlantis, V. Kondylis, V. Fernandez-Majada, M. Ermolaeva, P. Kirsch, A. Sterner-Kock, G. van Loo, Manolis Pasparakis, E. Wirnhier, M. Doblinger, D. Gunzelmann, J. Senker, B. v Lotsch, W. Schnick, H. Wu, Y. Chen, Zhigao Y. Wang, W. Li, J. Q. Li, L. Zhang, Y. J. Lu, G. Xu, X. Tan, Huayi Wang, W. Sun, Y. Shi, S. Burlingame, X. Gu, G. Cao, T. Zhang, J. Qin, J. Yang, H. M. Xu, D. H. Gutmann, L. G. Xu, C. Gonzalez-Agosti, R. Beauchamp, D. Pinney, C. Sterner, V. Ramesh, Yonghui Yang, J. Fujita, M. Tokuda, S. Bandoh, H. Dobashi, T. Okada, M. Okahara, T. Kishimoto, T. Ishida, J. Takahara, S. S. Yi, H. J. Kim, S. G. Do, Y. B. Lee, H. J. Ahn, I. K. Hwang, Y. S. Yoon, J. Zha, Q. Zhou, L. G. Xu, D. Chen, L. Li, Z. Zhai, H. B. Shu, D. Zhang, J. Lin, J. Han, X. Zhang, M. Cheng, S. K. Chintala, T. Sakamoto, Y. Hata, T. Kubota, T. Hisatomi, T. Murata, T. Ishibashi, H. Inomata, J. Zhao, S. Jitkaew, Z. Cai, S. Choksi, Q. Li, J. Luo, Z. G. Liu, L. Zhou, C. O. Hanemann, Huayi Wang, Liming Sun, Lijing Su, Josep Rizo, Lei Liu, Lai Li Feng Wang, Fu Sheng Wang, Xiaodong Wang, Huayi Wang, Zhigao Y. Wang, Sudan He, She Chen, Daohong Liao, Lai Li Feng Wang, Jiacong Yan, Weilong Liu, Xiaoguang Lei, Xiaodong Wang, Manolis Pasparakis, Peter Vandenabeele, Shanshan Feng, Yonghui Yang, Yide Mei, Li Ma, De e. Zhu, Naseruddin Hoti, Mark Castanares, Mian Wu, YoungSik Cho, Sreerupa Challa, David Moquin, Ryan Genga, Tathagat Dutta Ray, Melissa Guildford, Francis Ka Ming Chan, Peter Vandenabeele, Lorenzo Galluzzi, Tom vanden Berghe, e Guido Kroemer. 2012. "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha". *J Biol Chem* 7(1).
- Anon. 2011. "Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms". *Choice Reviews Online* 48(10). doi: 10.5860/choice.48-5678.
- Arellano-Reynoso, Beatriz, Nicolas Lapaque, Susana Salcedo, Gabriel Briones, Andrés Eduardo Ciocchini, Rodolfo Ugalde, Edgardo Moreno, Ignacio Moriyón, e Jean Pierre Gorvel. 2005. "Cyclic β -1,2-glucan is a brucella virulence factor required for intracellular survival". *Nature Immunology* 6(6). doi: 10.1038/ni1202.
- Bandara, Aloka B., Nammalwar Sriranganathan, Gerhardt G. Schurig, e Stephen M. Boyle. 2005. "Carboxyl-terminal protease regulates Brucella suis morphology in culture and persistence in macrophages and mice". *Journal of Bacteriology* 187(16). doi: 10.1128/JB.187.16.5767-5775.2005.
- von Bargen, Kristine, Jean Pierre Gorvel, e Suzana P. Salcedo. 2012. "Internal affairs: Investigating the Brucella intracellular lifestyle". *FEMS Microbiology Reviews* 36(3).
- Beck, Bonnie L., Louisa B. Tabatabai, John E. Mayfield, Bonnie L. Beck, Louisa B. Tabatabai, e John E. Mayfield. 1990. "A Protein Isolated from Brucella abortus Is a Cu-Zn Superoxide Dismutase". *Biochemistry* 29(2). doi: 10.1021/bi00454a010.
- de Bolle, Xavier, Sean Crosson, Jean Yves Matroule, e Jean Jacques Letesson. 2015. "Brucella abortus Cell Cycle and Infection Are Coordinated". *Trends in Microbiology* 23(12).
- Bruce, David. 1887. "Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever". *The Practitioner* 39:161–70.

- Burgener, Sabrina Sofia, Nathan Georges François Leborgne, Scott J. Snipas, Guy S. Salvesen, Phillip Ian Bird, e Charaf Benarafa. 2019. "Cathepsin G Inhibition by Serpinb1 and Serpinb6 Prevents Programmed Necrosis in Neutrophils and Monocytes and Reduces GSDMD-Driven Inflammation". *Cell Reports* 27(12). doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.065.
- Cardoso, Patrícia Gomes, Gilson Costa Macedo, Vasco Azevedo, e Sergio Costa Oliveira. 2006. "Brucella spp noncanonical LPS: Structure, biosynthesis, and interaction with host immune system". *Microbial Cell Factories* 5.
- Caroff, Martine, Doris Karibian, Jean Marc Cavaillon, e Nicole Haeffner-Cavaillon. 2002. "Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides". *Microbes and Infection* 4(9).
- Cascales, Eric, e Peter J. Christie. 2003. "The versatile bacterial type IV secretion systems". *Nature Reviews Microbiology* 1(2). doi: 10.1038/nrmicro753.
- Celli, Jean. 2006. "Surviving inside a macrophage: The many ways of Brucella". *Research in Microbiology* 157(2).
- Celli, Jean. 2015. "The changing nature of the Brucella-containing vacuole". *Cellular Microbiology* 17(7).
- Celli, Jean, Chantal de Chastellier, Don Marc Franchini, Javier Pizarro-Cerda, Edgardo Moreno, e Jean Pierre Gorvel. 2003. "Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum". *Journal of Experimental Medicine* 198(4). doi: 10.1084/jem.20030088.
- Celli, Jean, Suzana P. Salcedo, e Jean Pierre Gorvel. 2005. "Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(5). doi: 10.1073/pnas.0406873102.
- Cerqueira, Daiane M., Marco Túlio R. Gomes, Alexandre L. N. Silva, Marcella Rungue, Natan R. G. Assis, Erika S. Guimarães, Suellen B. Morais, Petr Broz, Dario S. Zamboni, e Sergio C. Oliveira. 2018. "Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to Brucella abortus infection". *PLoS Pathogens* 14(12). doi: 10.1371/journal.ppat.1007519.
- Chang, David W., Zheng Xing, Vanessa L. Capacio, Marcus E. Peter, e Xiaolu Yang. 2003. "Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation". *EMBO Journal* 22(16). doi: 10.1093/emboj/cdg414.
- Chang, David W., Zheng Xing, Yi Pan, Alicia Algeciras-Schimnich, Bryan C. Barnhart, Shoshanit Yaish-Ohad, Marcus E. Peter, e Xiaolu Yang. 2002. "C-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis". *EMBO Journal* 21(14). doi: 10.1093/emboj/cdf356.
- Chen, Fang, e Yongqun He. 2009. "Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough Brucella abortus". *PLoS ONE* 4(8). doi: 10.1371/journal.pone.0006830.
- Chen, Kaiwen W., Mercedes Monteleone, Dave Boucher, Gabriel Sollberger, Divya Ramnath, Nicholas D. Condon, Jessica B. von Pein, Petr Broz, Matthew J. Sweet, e Kate Schroder. 2018. "Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps". *Science Immunology* 3(26). doi: 10.1126/sciimmunol.aar6676.
- Chen, Lei, Qiao Wen Xie, e Carl Nathan. 1998. "Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates". *Molecular Cell* 1(6). doi: 10.1016/S1097-2765(00)80079-9.
- Christopher, Supriya, Umapathy B. L., e Ravikumar K. L. 2010. "Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis". *Journal of Laboratory Physicians* 2(02). doi: 10.4103/0974-2727.72149.
- Cleverley, Tesia L., Siri Peddineni, Jeannette Guarner, Francesca Cingolani, Pamela K. Garcia, Heather Koehler, Edward S. Mocarski, e Daniel Kalman. 2023. "The host-directed

- therapeutic imatinib mesylate accelerates immune responses to *Mycobacterium marinum* infection and limits pathology associated with granulomas". *PLOS Pathogens* 19(5):e1011387. doi: 10.1371/journal.ppat.1011387.
- Comerci, Diego J., Maria José Martínez-Lorenzo, Rodrigo Sieira, Jean Pierre Gorvel, e Rodolfo A. Ugalde. 2001. "Essential role of the virB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole". *Cellular Microbiology* 3(3). doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00102.x.
- Corbel, Michael J. 1997. "Brucellosis: An Overview". *Emerging Infectious Diseases* 3(2). doi: 10.3201/eid0302.970219.
- Corbel, MJ M. J. 2006. "Brucellosis in humans and animals Brucellosis in humans and animals". *WHO Library catalogue in publication Data*.
- Costa Franco, Miriam M., Fernanda Marim, Erika S. Guimarães, Natan R. G. Assis, Daiane M. Cerqueira, Juliana Alves-Silva, Jerome Harms, Gary Splitter, Judith Smith, Thirumala-Devi Kanneganti, Nina M. G. P. de Queiroz, Delia Gutman, Glen N. Barber, e Sergio C. Oliveira. 2018. " *Brucella abortus* Triggers a cGAS-Independent STING Pathway To Induce Host Protection That Involves Guanylate-Binding Proteins and Inflammasome Activation ". *The Journal of Immunology* 200(2). doi: 10.4049/jimmunol.1700725.
- Creagh, Emma M. 2014. "Caspase crosstalk: Integration of apoptotic and innate immune signalling pathways". *Trends in Immunology* 35(12).
- Czabotar, Peter E., Guillaume Lessene, Andreas Strasser, e Jerry M. Adams. 2014. "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(1).
- Delrue, R. M., M. Martínez-Lorenzo, P. Lestrate, I. Danese, V. Bielarz, P. Mertens, X. de Bolle, A. Tibor, J. P. Gorvel, e J. J. Letesson. 2001. "Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking". *Cellular Microbiology* 3(7). doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00131.x.
- Delvecchio, Vito G., Vinayak Kapatral, Rajendra J. Redkar, Guy Patra, Cesar Mujer, Tamara Los, Natalia Ivanova, Iain Anderson, Anamitra Bhattacharyya, Athanasios Lykidis, Gary Reznik, Lynn Jablonski, Niels Larsen, Mark D'Souza, Axel Bernal, Mikhail Mazur, Eugene Goltsman, Eugene Selkov, Philip H. Elzer, Sue Hagius, David O'Callaghan, Jean Jacques Letesson, Robert Haselkorn, Nikos Kyrpides, e Ross Overbeek. 2002. "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(1). doi: 10.1073/pnas.221575398.
- Ding, Jingjin, Kun Wang, Wang Liu, Yang She, Qi Sun, Jianjin Shi, Hanzi Sun, Da Cheng Wang, e Feng Shao. 2016. "Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family". *Nature* 535(7610). doi: 10.1038/nature18590.
- Dondelinger, Yves, Wim Declercq, Sylvie Montessuit, Ria Roelandt, Amanda Goncalves, Inge Bruggeman, Paco Hulpiau, Kathrin Weber, Clark A. Sehon, Robert W. Marquis, John Bertin, Peter J. Gough, Savvas Savvides, Jean Claude Martinou, Mathieu J. M. Bertrand, e Peter Vandenabeele. 2014. "MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates". *Cell Reports* 7(4). doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.026.
- Ebert, Gregor, Cody Allison, Simon Preston, James Cooney, Jesse G. Toe, Michael D. Stutz, Samar Ojaimi, Nikola Baschuk, Ueli Nachbur, Joseph Torresi, John Silke, C. Glenn Begley, e Marc Pellegrini. 2015. "Eliminating hepatitis B by antagonizing cellular inhibitors of apoptosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(18). doi: 10.1073/pnas.1502400112.
- Endley, S., D. McMurray, e T. A. Ficht. 2001. "Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection". *Journal of Bacteriology* 183(8). doi: 10.1128/JB.183.8.2454-2462.2001.

- Erridge, Clett, Elliott Bennett-Guerrero, e Ian R. Poxton. 2002. "Structure and function of lipopolysaccharides". *Microbes and Infection* 4(8).
- Feltham, Rebecca, James E. Vince, e Kate E. Lawlor. 2017. "Caspase-8: Not so silently deadly". *Clinical and Translational Immunology* 6(1).
- Feng, Shanshan, Yonghui Yang, Yide Mei, Li Ma, De e. Zhu, Naseruddin Hoti, Mark Castanares, e Mian Wu. 2007. "Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain". *Cellular Signalling* 19(10). doi: 10.1016/j.cellsig.2007.05.016.
- Fernandes-Alnemri, T., J. Wu, J. W. Yu, P. Datta, B. Miller, W. Jankowski, S. Rosenberg, J. Zhang, e E. S. Alnemri. 2007. "The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation". *Cell Death and Differentiation* 14(9). doi: 10.1038/sj.cdd.4402194.
- Fernandez-Prada, Carmen M., Elzbieta B. Zelazowska, Mikeljon Nikolich, Ted L. Hadfield, R. Martin Roop, Gregory L. Robertson, e David L. Hoover. 2003. "Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: Bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis". *Infection and Immunity* 71(4). doi: 10.1128/IAI.71.4.2110-2119.2003.
- Fink, Susan L., e Brad T. Cookson. 2006. "Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages". *Journal of Immunology* 202(7). doi: 10.1111/J.1462-5822.2006.00751.x.
- Franco, María Pía, Maximilian Mulder, Robert H. Gilman, e Henk L. Smits. 2007. "Human brucellosis". *Lancet Infectious Diseases* 7(12).
- Fritsch, Melanie, Saskia D. Günther, Robin Schwarzer, Marie Christine Albert, Fabian Schorn, J. Paul Werthenbach, Lars M. Schiffmann, Neil Stair, Hannah Stocks, Jens M. Seeger, Mohamed Lamkanfi, Martin Krönke, Manolis Pasparakis, e Hamid Kashkar. 2019. "Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis". *Nature* 575(7784). doi: 10.1038/s41586-019-1770-6.
- Gaidt, Moritz M., Thomas S. Ebert, Dhruv Chauhan, Tobias Schmidt, Jonathan L. Schmid-Burgk, Francesca Rapino, Avril A. B. Robertson, Matthew A. Cooper, Thomas Graf, e Veit Hornung. 2016. "Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway". *Immunity* 44(4). doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.012.
- Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, Lucia Altucci, Ivano Amelio, David W. Andrews, Margherita Annicchiarico-Petruzzelli, Alexey V. Antonov, Eli Arama, Eric H. Baehrecke, Nikolai A. Barlev, Nicolas G. Bazan, Francesca Bernassola, Mathieu J. M. Bertrand, Katuscia Bianchi, Mikhail V. Blagosklonny, Klas Blomgren, Christoph Borner, Patricia Boya, Catherine Brenner, Michelangelo Campanella, Eleonora Candi, Didac Carmona-Gutierrez, Francesco Cecconi, Francis K. M. Chan, Navdeep S. Chandel, Emily H. Cheng, Jerry E. Chipuk, John A. Cidlowski, Aaron Ciechanover, Gerald M. Cohen, Marcus Conrad, Juan R. Cubillos-Ruiz, Peter E. Czabotar, Vincenzo D'Angiolella, Ted M. Dawson, Valina L. Dawson, Vincenzo De Laurenzi, Ruggero De Maria, Klaus Michael Debatin, Ralph J. Deberardinis, Mohanish Deshmukh, Nicola Di Daniele, Francesco Di Virgilio, Vishva M. Dixit, Scott J. Dixon, Colin S. Duckett, Brian D. Dynlacht, Wafik S. El-Deiry, John W. Elrod, Gian Maria Fimia, Simone Fulda, Ana J. García-Sáez, Abhishek D. Garg, Carmen Garrido, Evripidis Gavathiotis, Pierre Golstein, Eyal Gottlieb, Douglas R. Green, Lloyd A. Greene, Hinrich Gronemeyer, Atan Gross, Gyorgy Hajnoczky, J. Marie Hardwick, Isaac S. Harris, Michael O. Hengartner, Claudio Hetz, Hidenori Ichijo, Marja Jäättelä, Bertrand Joseph, Philipp J. Jost, Philippe P. Juin, William J. Kaiser, Michael Karin, Thomas Kaufmann, Oliver Kepp, Adi Kimchi, Richard N. Kitsis, Daniel J. Klionsky, Richard A. Knight, Sharad Kumar, Sam W. Lee, John J. Lemasters, Beth Levine, Andreas Linkermann, Stuart A. Lipton,

- Richard A. Lockshin, Carlos López-Otín, Scott W. Lowe, Tom Luedde, Enrico Lugli, Marion MacFarlane, Frank Madeo, Michal Malewicz, Walter Malorni, Gwenola Manic, Jean Christophe Marine, Seamus J. Martin, Jean Claude Martinou, Jan Paul Medema, Patrick Mehlen, Pascal Meier, Sonia Melino, Edward A. Miao, Jeffery D. Molkenin, Ute M. Moll, Cristina Muñoz-Pinedo, Shigekazu Nagata, Gabriel Nuñez, Andrew Oberst, Moshe Oren, Michael Overholtzer, Michele Pagano, Theocharis Panaretakis, Manolis Pasparakis, Josef M. Penninger, David M. Pereira, Shazib Pervaiz, Marcus E. Peter, Mauro Piacentini, Paolo Pinton, Jochen H. M. Prehn, Hamsa Puthalakath, Gabriel A. Rabinovich, Markus Rehm, Rosario Rizzuto, Cecilia M. P. Rodrigues, David C. Rubinsztein, Thomas Rudel, Kevin M. Ryan, Emre Sayan, Luca Scorrano, Feng Shao, Yufang Shi, John Silke, Hans Uwe Simon, Antonella Sistigu, Brent R. Stockwell, Andreas Strasser, Gyorgy Szabadkai, Stephen W. G. Tait, Daolin Tang, Nektarios Tavernarakis, Andrew Thorburn, Yoshihide Tsujimoto, Boris Turk, Tom Vanden Berghe, Peter Vandenabeele, Matthew G. Vander Heiden, Andreas Villunger, Herbert W. Virgin, Karen H. Vousden, Domagoj Vucic, Erwin F. Wagner, Henning Walczak, David Wallach, Ying Wang, James A. Wells, Will Wood, Junying Yuan, Zahra Zakeri, Boris Zhivotovsky, Laurence Zitvogel, Gerry Melino, e Guido Kroemer. 2018. "Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018". *Cell Death and Differentiation* 25(3).
- Ganesan, Sandhya, Vijay A. K. Rathinam, Lukas Bossaller, Kelly Army, William J. Kaiser, Edward S. Mocarski, Christopher P. Dillon, Douglas R. Green, Tanya N. Mayadas, Stuart M. Levitz, Amy G. Hise, Neal Silverman, e Katherine A. Fitzgerald. 2014. "Caspase-8 Modulates Dectin-1 and Complement Receptor 3–Driven IL-1 β Production in Response to β -Glucans and the Fungal Pathogen, *Candida albicans*". *The Journal of Immunology* 193(5). doi: 10.4049/jimmunol.1400276.
- Gee, Jason M., Michelle Wright Valderas, Michael E. Kovach, Vanessa K. Grippe, Gregory T. Robertson, Wai Leung Ng, John M. Richardson, Malcolm E. Winkler, e R. Martin Roop. 2005. "The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice". *Infection and Immunity* 73(5). doi: 10.1128/IAI.73.5.2873-2880.2005.
- Ghanbari, Mahboubeh Khaton, Hasan Abolghasem Gorji, Masoud Behzadifar, Nadia Sane, Nafiu Mehedi, e Nicola Luigi Bragazzi. 2020. "One health approach to tackle brucellosis: a systematic review". *Tropical Medicine and Health* 48(1).
- Glynn, M. Kathleen, e Tracey v. Lynn. 2008. "Brucellosis". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233(6).
- Gomes, Marco Tulio R., Priscila C. Campos, Fernanda S. Oliveira, Patricia P. Corsetti, Karina R. Bortoluci, Larissa D. Cunha, Dario S. Zamboni, e Sergio C. Oliveira. 2013. "Critical Role of ASC Inflammasomes and Bacterial Type IV Secretion System in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to *Brucella abortus* Infection". *The Journal of Immunology* 190(7). doi: 10.4049/jimmunol.1202817.
- Gomez, Gabriel, Leslie G. Adams, Allison Rice-Ficht, e Thomas A. Ficht. 2013. "Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4(MAY).
- Gonçalves, Augusto V., Shally R. Margolis, Gustavo F. S. Quirino, Danielle P. A. Mascarenhas, Isabella Rauch, Randilea D. Nichols, Eduard Ansaldo, Mary F. Fontana, Russell E. Vance, e Dario S. Zamboni. 2019. "Gasdermin-D and caspase-7 are the key caspase-1/8 substrates downstream of the NAIP5/NLRC4 inflammasome required for restriction of legionella pneumophila". *PLoS Pathogens* 15(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1007886.
- Gonzalez Ramirez, Monica L., Marcin Poreba, Scott J. Snipas, Katarzyna Groborz, Marcin Drag, e Guy S. Salvesen. 2018. "Extensive peptide and natural protein substrate screens reveal

- that mouse caspase-11 has much narrower substrate specificity than caspase-1". *Journal of Biological Chemistry* 293(18).
- Gopal, Rajesh Kanna, e Sanniyasi Elumalai. 2017. "Industrial Production of Superoxide Dismutase (SOD): A Mini Review". *Journal of Probiotics & Health* 05(03). doi: 10.4172/2329-8901.1000179.
- Gorvel, Jean Pierre, e Edgardo Moreno. 2002. "Brucella intracellular life: From invasion to intracellular replication". *Veterinary Microbiology* 90(1–4). doi: 10.1016/S0378-1135(02)00214-6.
- Grillá, María Jesús, José María Blasco, Jean Pierre Gorvel, Ignacio Moriyán, e Edgardo Moreno. 2012. "What have we learned from brucellosis in the mouse model?" *Veterinary Research* 43(1).
- Gross, Antoine, Annie Terraza, Safia Ouahrani-Bettache, Jean Pierre Liautard, e Jacques Dornand. 2000. "In vitro Brucella suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells". *Infection and Immunity* 68(1). doi: 10.1128/IAI.68.1.342-351.2000.
- Gurung, Prajwal, e Thirumala Devi Kanneganti. 2015. "Novel Roles for Caspase-8 in IL-1 β and Inflammasome Regulation". *American Journal of Pathology* 185(1).
- Guzmán-Verri, Caterina, Esteban Chaves-Olarte, Christoph von Eichel-Streiber, Ignacio López-Goñi, Monica Thelestam, Staffan Arvidson, Jean Pierre Gorvel, e Edgardo Moreno. 2001. "GTPases of the Rho subfamily are required for Brucella abortus internalization in nonprofessional phagocytes: Direct activation of Cdc42". *Journal of Biological Chemistry* 276(48). doi: 10.1074/jbc.M105606200.
- Hagar, Jon A., Daniel A. Powell, Youssef Aachoui, Robert K. Ernst, e Edward A. Miao. 2013. "Cytoplasmic LPS activates caspase-11: Implications in TLR4-independent endotoxic shock". *Science* 341(6151). doi: 10.1126/science.1240988.
- Hara, Hideki, Sergey S. Seregin, Dahai Yang, Koichi Fukase, Mathias Chamaillard, Emad S. Alnemri, Naohiro Inohara, Grace Y. Chen, e Gabriel Núñez. 2018. "The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection". *Cell* 175(6). doi: 10.1016/j.cell.2018.09.047.
- He, Sudan, Lai Wang, Lin Miao, Tao Wang, Fenghe Du, Liping Zhao, e Xiaodong Wang. 2009. "Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α ". *Cell* 137(6). doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021.
- He, Yongqun, Sherry Reichow, Sheela Ramamoorthy, Xicheng Ding, Raju Lathigra, Johanna C. Craig, Bruno W. S. Sobral, Gerhardt G. Schurig, Nammalwar Sriranganathan, e Stephen M. Boyle. 2006. "Brucella melitensis triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages". *Infection and Immunity* 74(9). doi: 10.1128/IAI.01998-05.
- Heilig, Rosalie, Mathias S. Dick, Lorenzo Sborgi, Etienne Meunier, Sebastian Hiller, e Petr Broz. 2018. "The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice". *European Journal of Immunology* 48(4). doi: 10.1002/eji.201747404.
- Huang, Li-Yun, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Julio Aliberti, e Basil Golding. 2005. "Th1-Like Cytokine Induction by Heat-Killed Brucella abortus Is Dependent on Triggering of TLR 9". *The Journal of Immunology* 175(6). doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3964.
- Hughes, Michelle A., Nicholas Harper, Michael Butterworth, Kelvin Cain, Gerald M. Cohen, e Marion MacFarlane. 2009. "Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival". *Molecular Cell* 35(3). doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.012.
- Hull, Noah C., e Brant A. Schumaker. 2018. "Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine". *Infection Ecology and Epidemiology* 8(1).
- Ishikawa, Hiroki, e Glen N. Barber. 2008. "STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling". *Nature* 455(7213). doi: 10.1038/nature07317.

- Jones, Jonathan W., Nobuhiko Kayagaki, Petr Broz, Thomas Henry, Kim Newton, Karen O'Rourke, Salina Chan, Jennifer Dong, Yan Qu, Meron Roose-Girma, Vishva M. Dixit, e Denise M. Monack. 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(21). doi: 10.1073/pnas.1003738107.
- de Jong, Maarten F., Yao Hui Sun, Andreas B. den Hartigh, Jan Maarten van Dijk, e Renée M. Tsois. 2008. "Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system". *Molecular Microbiology* 70(6). doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x.
- Jorgensen, Ine, Yue Zhang, Bryan A. Krantz, e Edward A. Miao. 2016. "Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis". *Journal of Experimental Medicine* 213(10). doi: 10.1084/jem.20151613.
- Kaiser, William J., Jason W. Upton, Alyssa B. Long, Devon Livingston-Rosanoff, Lisa P. Daley-Bauer, Razqallah Hakem, Tamara Caspary, e Edward S. Mocarski. 2011. "RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice". *Nature* 471(7338). doi: 10.1038/nature09857.
- Kambara, Hiroto, Fei Liu, Xiaoyu Zhang, Peng Liu, Besnik Bajrami, Yan Teng, Li Zhao, Shiyi Zhou, Hongbo Yu, Weidong Zhou, Leslie E. Silberstein, Tao Cheng, Mingzhe Han, Yuanfu Xu, e Hongbo R. Luo. 2018. "Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death". *Cell Reports* 22(11). doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.067.
- Kang, Tae-Bong, Gi-Su Oh, Elke Scandella, Beatrice Bolinger, Burkhard Ludewig, Andrew Kovalenko, e David Wallach. 2008. "Mutation of a Self-Processing Site in Caspase-8 Compromises Its Apoptotic but Not Its Nonapoptotic Functions in Bacterial Artificial Chromosome-Transgenic Mice". *The Journal of Immunology* 181(4). doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2522.
- Kawai, Taro, e Shizuo Akira. 2011. "Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity". *Immunity* 34(5).
- Kayagaki, Nobuhiko, Irma B. Stowe, Bettina L. Lee, Karen O'Rourke, Keith Anderson, Søren Warming, Trinna Cuellar, Benjamin Haley, Merone Roose-Girma, Qui T. Phung, Peter S. Liu, Jennie R. Lill, Hong Li, Jiansheng Wu, Sarah Kummerfeld, Juan Zhang, Wyne P. Lee, Scott J. Snipas, Guy S. Salvesen, Lucy X. Morris, Linda Fitzgerald, Yafei Zhang, Edward M. Bertram, Christopher C. Goodnow, e Vishva M. Dixit. 2015. "Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling". *Nature* 526(7575). doi: 10.1038/nature15541.
- Kayagaki, Nobuhiko, Søren Warming, Mohamed Lamkanfi, Lieselotte vande Walle, Salina Louie, Jennifer Dong, Kim Newton, Yan Qu, Jinfeng Liu, Sherry Heldens, Juan Zhang, Wyne P. Lee, Merone Roose-Girma, e Vishva M. Dixit. 2011. "Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11". *Nature* 479(7371). doi: 10.1038/nature10558.
- Kayagaki, Nobuhiko, Michael T. Wong, Irma B. Stowe, Sree Ranjani Ramani, Lino C. Gonzalez, Sachiko Akashi-Takamura, Kensuke Miyake, Juan Zhang, Wyne P. Lee, Artur Muszynski, Lennart S. Forsberg, Russell W. Carlson, e Vishva M. Dixit. 2013. "Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4". *Science* 341(6151). doi: 10.1126/science.1240248.
- Kim, Suk. 2015. "The Interaction Between *Brucella* and the Host Cell in Phagocytosis". em *Updates on Brucellosis*.
- Köhler, Stephan, Vincent Foulongne, Safia Ouahrani-Bettache, Gisèle Bourg, Jacques Teyssier, Michel Ramuz, e Jean Pierre Liutard. 2002. "The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(24). doi: 10.1073/pnas.232454299.

- Kumar, Himanshu, Taro Kawai, e Shizuo Akira. 2011. "Pathogen recognition by the innate immune system". *International Reviews of Immunology* 30(1). doi: 10.3109/08830185.2010.529976.
- Kurdoglu, Mertihan, Ertan Adali, Zehra Kurdoglu, Mustafa Kasim Karahocagil, Ali Kolusari, Recep Yildizhan, Zehra Kucukaydin, Hanim Guler Sahin, Mansur Kamaci, e Hayrettin Akdeniz. 2010. "Brucellosis in pregnancy: A 6-year clinical analysis". *Archives of Gynecology and Obstetrics* 281(2). doi: 10.1007/s00404-009-1106-0.
- Lamkanfi, M., W. Declercq, M. Kalai, X. Saelens, e P. Vandenabeele. 2002. "Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man". *Cell Death and Differentiation* 9(4). doi: 10.1038/sj.cdd.4400989.
- Lamkanfi, Mohamed, e Vishva M. Dixit. 2009. "Inflammasomes: Guardians of cytosolic sanctity". *Immunological Reviews* 227(1).
- Lamkanfi, Mohamed, e Thirumala Devi Kanneganti. 2010. "Caspase-7: A protease involved in apoptosis and inflammation". *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42(1).
- Lamkanfi, Mohamed, Thirumala Devi Kanneganti, Petra van Damme, Tom vanden Berghe, Isabel Vanoverberghe, Joël Vandekerckhove, Peter Vandenabeele, Kris Gevaert, e Gabriel Núñez. 2008. "Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes". *Molecular and Cellular Proteomics* 7(12). doi: 10.1074/mcp.M800132-MCP200.
- Lamkanfi, Mohamed, Lilian O. Moreira, Patrudu Makena, Diana C. J. Spierings, Kelli Boyd, Peter J. Murray, Douglas R. Green, e Thirumala Devi Kanneganti. 2009. "Caspase-7 deficiency protects from endotoxin-induced lymphocyte apoptosis and improves survival". *Blood* 113(12). doi: 10.1182/blood-2008-09-178038.
- Lapaque, Nicolas, Ignacio Moriyon, Edgardo Moreno, e Jean Pierre Gorvel. 2005. "Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor". *Current Opinion in Microbiology* 8(1).
- Lavigne, Jean Philippe, Gilles Patey, Felix J. Sangari, Gisèle Bourg, Michel Ramuz, David O'Callaghan, e Sylvie Michaux-Charachon. 2005. "Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*". *Infection and Immunity* 73(9). doi: 10.1128/IAI.73.9.5524-5529.2005.
- Lawinsky, Maria Luiza de Jesus, Patricia Miyuki Ohara, Mauro da Rosa Elkhoury, Nelma do Carmo Faria, e Karina Ribeiro Leite Jardim Cavalcante. 2010. "Estado da arte da brucelose em humanos". *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1(4). doi: 10.5123/s2176-62232010000400012.
- Lee, Bettina L., Kathleen M. Mirrashidi, Irma B. Stowe, Sarah K. Kummerfeld, Colin Watanabe, Benjamin Haley, Trinna L. Cuellar, Michael Reichelt, e Nobuhiko Kayagaki. 2018. "ASC- A nd caspase-8-dependent apoptotic pathway diverges from the NLRC4 inflammasome in macrophages". *Scientific Reports* 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-21998-3.
- Lemmers, Bénédicte, Leonardo Salmena, Nicolas Bidère, Helen Su, Elzbieta Matysiak-Zablocki, Kiichi Murakami, Pamela S. Ohashi, Andrea Jurisicova, Michael Lenardo, Razqallah Hakem, e Anne Hakem. 2007. "Essential role for caspase-8 in toll-like receptors and NFκB signaling". *Journal of Biological Chemistry* 282(10). doi: 10.1074/jbc.M606721200.
- Li, Honglin, Hong Zhu, Chi Jie Xu, e Junying Yuan. 1998. "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis". *Cell* 94(4). doi: 10.1016/S0092-8674(00)81590-1.
- Lieberman, Judy, Hao Wu, e Jonathan C. Kagan. 2019. "Gasdermin D activity in inflammation and host defense". *Science Immunology* 4(39). doi: 10.1126/sciimmunol.aav1447.
- Limei Wang, Haijing Yan, Xiaomeng Chen, Jieun Lee, Jintao Sun, Guibo Liu, Hua Yang, Danli Lu, Wenting Liu, Chengye Che. 2022. "Caspase-8 is involved in pyroptosis, necroptosis and the maturation and release of IL-1β in *Aspergillus fumigatus* keratitis". *International Immunopharmacology*.

- Lin, Yong, Anne Devin, Yolanda Rodriguez, e Zheng Gang Liu. 1999. "Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis". *Genes and Development* 13(19). doi: 10.1101/gad.13.19.2514.
- Lindahl, Johanna F., Catherine E. Vrentas, Ram P. Deka, Razibuddin A. Hazarika, H. Rahman, R. G. Bambal, J. S. Bedi, C. Bhattacharya, Pallab Chaduhuri, Nadeem Mohamed Fairoze, R. S. Gandhi, J. P. S. Gill, N. K. Gupta, M. Kumar, S. Londhe, M. Rahi, P. K. Sharma, R. Shome, R. Singh, K. Srinivas, e B. B. Swain. 2020. "Brucellosis in India: results of a collaborative workshop to define One Health priorities". *Tropical Animal Health and Production* 52(1). doi: 10.1007/s11250-019-02029-3.
- Liu, Xing, Zhibin Zhang, Jianbin Ruan, Youdong Pan, Venkat Giri Magupalli, Hao Wu, e Judy Lieberman. 2016. "Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores". *Nature* 535(7610). doi: 10.1038/nature18629.
- Loisel-Meyer, Séverine, Maria Pilar Jiménez De Bagüés, Stephan Köhler, Jean Pierre Liautard, e Véronique Jubier-Maurin. 2005. "Differential use of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis* for in vitro and intramacrophagic multiplication". *Infection and Immunity* 73(11). doi: 10.1128/IAI.73.11.7768-7771.2005.
- López-Goñi, I., C. Guzmán-Verri, L. Manterola, A. Sola-Landa, I. Moriyón, e E. Moreno. 2002. "Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS". *Veterinary Microbiology* 90(1–4). doi: 10.1016/S0378-1135(02)00218-3.
- Ma, Zhongchen, Ruirui Li, Ruirui Hu, Xiaoyu Deng, Yimei Xu, Wei Zheng, Jihai Yi, Yong Wang, e Chuangfu Chen. 2020. "*Brucella abortus* BspJ Is a Nucleomodulin That Inhibits Macrophage Apoptosis and Promotes Intracellular Survival of *Brucella*". *Frontiers in Microbiology* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.599205.
- Macedo, Gilson Costa, Diogo Matos Magnani, Natalia Barbosa Carvalho, Oscar Bruna-Romero, Ricardo T. Gazzinelli, e Sergio Costa Oliveira. 2008. "Central Role of MyD88-Dependent Dendritic Cell Maturation and Proinflammatory Cytokine Production to Control *Brucella abortus* Infection". *The Journal of Immunology* 180(2). doi: 10.4049/jimmunol.180.2.1080.
- Maelfait, Jonathan, Elisabeth Vercammen, Sophie Janssens, Peter Schotte, Mira Haegman, Stefan Magez, e Rudi Beyaert. 2008. "Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 β maturation by caspase-8". *Journal of Experimental Medicine* 205(9). doi: 10.1084/jem.20071632.
- Malik, Ankit, e Thirumala Devi Kanneganti. 2017. "Inflammasome activation and assembly at a glance". *Journal of Cell Science* 130(23). doi: 10.1242/jcs.207365.
- Man, Si Ming, e Thirumala Devi Kanneganti. 2016. "Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity". *Nature Reviews Immunology* 16(1).
- Man, Si Ming, Panagiotis Tourlomousis, Lee Hopkins, Tom P. Monie, Katherine A. Fitzgerald, e Clare E. Bryant. 2013. "Salmonella Infection Induces Recruitment of Caspase-8 to the Inflammasome To Modulate IL-1 β Production". *The Journal of Immunology* 191(10). doi: 10.4049/jimmunol.1301581.
- Manterola, Lorea, Caterina Guzmán-Verri, Esteban Chaves-Olarte, Elías Barquero-Calvo, María Jesús de Miguel, Ignacio Moriyón, María Jesús Grilló, Ignacio López-Goñi, e Edgardo Moreno. 2007. "BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence". *Infection and Immunity* 75(10). doi: 10.1128/IAI.00439-07.
- Manzanillo, Paolo S., Michael U. Shiloh, Daniel A. Portnoy, e Jeffery S. Cox. 2012. "Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages". *Cell Host and Microbe* 11(5). doi: 10.1016/j.chom.2012.03.007.
- Martin, Daniel W., John E. Baumgartner, Jason M. Gee, Eric S. Anderson, e Il Martin Roop. 2012. "SodA is a major metabolic antioxidant in *Brucella abortus* 2308 that plays a

- significant, but limited, role in the virulence of this strain in the mouse model". *Microbiology (United Kingdom)* 158(7). doi: 10.1099/mic.0.059584-0.
- Martin, David A., Richard M. Siegel, Lixin Zheng, e Michael J. Lenardo. 1998. "Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH α 1) death signal". *Journal of Biological Chemistry* 273(8). doi: 10.1074/jbc.273.8.4345.
- Martínez-Núñez, Carola, Pamela Altamirano-Silva, Francisco Alvarado-Guillén, Edgardo Moreno, Caterina Guzmán-Verri, e Esteban Chaves-Olarte. 2010. "The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*". *Journal of Bacteriology* 192(21). doi: 10.1128/JB.00567-10.
- Mascarenhas, Danielle P. A., Daiane M. Cerqueira, Marcelo S. F. Pereira, Fernanda V. S. Castanheira, Talita D. Fernandes, Grazielle Z. Manin, Larissa D. Cunha, e Dario S. Zamboni. 2017. "Inhibition of caspase-1 or gasdermin-D enable caspase-8 activation in the Naip5/NLRC4/ASC inflammasome". *PLoS Pathogens* 13(8). doi: 10.1371/journal.ppat.1006502.
- MEGID, J. ., e L. A. MATHIAS. 2016. "Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia." *Brucelose*.
- Miao, Edward A., Irina A. Leaf, Piper M. Treuting, Dat P. Mao, Monica Dors, Anasuya Sarkar, Sarah E. Warren, Mark D. Wewers, e Alan Aderem. 2010. "Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria". *Nature Immunology* 11(12). doi: 10.1038/ni.1960.
- Micheau, Olivier, Margot Thome, Pascal Schneider, Nils Holler, Jürg Tschopp, Donald W. Nicholson, Christophe Briand, e Markus G. Grütter. 2002. "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex". *Journal of Biological Chemistry* 277(47). doi: 10.1074/jbc.M206882200.
- Monie, Tom P., e Clare E. Bryant. 2015. "Caspase-8 functions as a key mediator of inflammation and pro-IL-1 β processing via both canonical and non-canonical pathways". *Immunological Reviews* 265(1).
- Moreno, Edgardo. 2014. "Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis". *Frontiers in Microbiology* 5(MAY).
- Muzio, Marta, Brent R. Stockwell, Henning R. Stennicke, Guy S. Salvesen, e Vishva M. Dixit. 1998. "An induced proximity model for caspase-8 activation". *Journal of Biological Chemistry* 273(5). doi: 10.1074/jbc.273.5.2926.
- N. Xavier, Mariana, Tatiane A. Paixao, Andreas B. den Hartigh, Renee M. Tsohis, e Renato L. Santos. 2014. "Pathogenesis of *Brucella* spp." *The Open Veterinary Science Journal* 4(1). doi: 10.2174/1874318801004010109.
- Nagakannan Pandian, Thirumala-Devi Kanneganti. 2022. "PANoptosis: A Unique Innate Immune Inflammatory Cell Death Modality". *The Journal Immunology* 1625–33.
- Nagata, Shigekazu. 2018. "Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells". *Annual Review of Immunology* 36. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.
- Neta, Alcina V. Carvalho, Juliana P. S. Mol, Mariana N. Xavier, Tatiane A. Paixão, Andrey P. Lage, e Renato L. Santos. 2010. "Pathogenesis of bovine brucellosis". *Veterinary Journal* 184(2).
- Neto, José Soares Ferreira, Gabriela Bicca da Silveira, Barbara Medeiros Rosa, Vitor Salvador Picão Gonçalves, José Henrique Hildebrand Gris-Filho, Marcos Amaku, Ricardo Augusto Dias, Fernando Ferreira, Marcos Bryan Heinemann, Evelise Oliveira Telles, e Andrey Pereira Lage. 2016. "Analysis of 15 years of the national program for the control and eradication of animal brucellosis and tuberculosis, Brazil". *Semina: Ciências Agrárias* 37(5).
- Newton, Kim, Katherine E. Wickliffe, Allie Maltzman, Debra L. Dugger, Rohit Reja, Yue Zhang, Merone Roose-Girma, Zora Modrusan, Meredith S. Sagolla, Joshua D. Webster, e Vishva

- M. Dixit. 2019. "Activity of caspase-8 determines plasticity between cell death pathways". *Nature* 575(7784). doi: 10.1038/s41586-019-1752-8.
- Oberst, A., Christopher P. Dillon, Ricardo Weinlich, Laura L. McCormick, Patrick Fitzgerald, Cristina Pop, Razq Hakem, Guy S. Salvesen, e Douglas R. Green. 2011. "Catalytic of caspase-8-FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis". *Nature* 471(7338).
- O'Cellaghan, David, Chantal Cazevielle, Annick Allardet-Servent, Maria Laura Boschiroli, Gisèle Bourg, Vincent Foulongne, Patrice Frutos, Youri Kulakov, e Michel Ramuz. 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(6). doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01569.x.
- van Opdenbosch, Nina, Hanne van Gorp, Maarten Verdonckt, Pedro H. V. Saavedra, Nathalia M. de Vasconcelos, Amanda Gonçalves, Lieselotte vande Walle, Dieter Demon, Magdalena Matusiak, Filip van Hauwermeiren, Jinke D'Hont, Tino Hochepped, Stefan Krautwald, Thirumala Devi Kanneganti, e Mohamed Lamkanfi. 2017. "Caspase-1 Engagement and TLR-Induced c-FLIP Expression Suppress ASC/Caspase-8-Dependent Apoptosis by Inflammasome Sensors NLRP1b and NLRC4". *Cell Reports* 21(12). doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.088.
- Orning, Pontus, e Egil Lien. 2021. "Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity". *Journal of Leukocyte Biology* 109(1).
- Orning, Pontus, Dan Weng, Kristian Starheim, Dmitry Ratner, Zachary Best, Bettina Lee, Alexandria Brooks, Shiyu Xia, Hao Wu, Michelle A. Kelliher, Scott B. Berger, Peter J. Gough, John Bertin, Megan M. Proulx, Jon D. Goguen, Nobuhiko Kayagaki, Katherine A. Fitzgerald, e Egil Lien. 2018. "Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death". *Science* 362(6418). doi: 10.1126/science.aau2818.
- Pappas, Georgios, Photini Papadimitriou, Nikolaos Akritidis, Leonidas Christou, e Epameinondas v. Tsianos. 2006. "The new global map of human brucellosis". *Lancet Infectious Diseases* 6(2).
- Pereira, Carine Rodrigues, Izabela Regina Cardoso de Oliveira, Luciana Faria de Oliveira, Camila Stefanie Fonseca de Oliveira, Andrey Pereira Lage, e Elaine Maria Seles Dorneles. 2021. "Accidental exposure to *Brucella abortus* vaccines and occupational brucellosis among veterinarians in Minas Gerais state, Brazil". *Transboundary and Emerging Diseases* 68(3). doi: 10.1111/tbed.13797.
- Philip, Naomi H., Alexandra DeLaney, Lance W. Peterson, Melanie Santos-Marrero, Jennifer T. Grier, Yan Sun, Meghan A. Wynosky-Dolfi, Erin E. Zwack, Baofeng Hu, Tayla M. Olsen, Anthony Rongvaux, Scott D. Pope, Carolina B. López, Andrew Oberst, Daniel P. Beiting, Jorge Henao-Mejia, e Igor E. Brodsky. 2016. "Activity of Uncleaved Caspase-8 Controls Anti-bacterial Immune Defense and TLR-Induced Cytokine Production Independent of Cell Death". *PLoS Pathogens* 12(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1005910.
- Philip, Naomi H., Christopher P. Dillon, Annelise G. Snyder, Patrick Fitzgerald, Meghan A. Wynosky-Dolfi, Erin E. Zwack, Baofeng Hu, Louise Fitzgerald, Elizabeth A. Mauldin, Alan M. Copenhaver, Sunny Shin, Lei Wei, Matthew Parker, Jinghui Zhang, Andrew Oberst, Douglas R. Green, e Igor E. Brodsky. 2014. "Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- κ B and MAPK signaling". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(20). doi: 10.1073/pnas.1403477111.
- Pihán, Philippe, Amado Carreras-Sureda, e Claudio Hetz. 2017. "BCL-2 family: Integrating stress responses at the ER to control cell demise". *Cell Death and Differentiation* 24(9).
- Pizarro-Cerdá, Javier, Stéphane Méresse, Robert G. Parton, Gisou van der Goot, Alberto Sola-Landa, Ignacio Lopez-Goñi, Edgardo Moreno, e Jean Pierre Gorvel. 1998. "Brucella

- abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes". *Infection and Immunity* 66(12). doi: 10.1128/iai.66.12.5711-5724.1998.
- Pizarro-Cerdá, Javier, Edgardo Moreno, e Jean Pierre Gorvel. 2000. "Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells". *Microbes and Infection* 2(7).
- Poester, Fernando Padilla, Vítor Salvador Picão Gonçalves, e Andrey Pereira Lage. 2002. "Brucellosis in Brazil". *Veterinary Microbiology* 90(1–4). doi: 10.1016/S0378-1135(02)00245-6.
- Poreba, Marcin, Katarzyna Groborz, Mario Navarro, Scott J. Snipas, Marcin Drag, e Guy S. Salvesen. 2019. "Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms". *Cell Death and Differentiation* 26(2). doi: 10.1038/s41418-018-0110-y.
- Proch, V., B. B. Singh, K. Schemann, J. P. S. Gill, M. P. Ward, e N. K. Dhand. 2018. "Risk factors for occupational *Brucella* infection in veterinary personnel in India". *Transboundary and Emerging Diseases* 65(3). doi: 10.1111/tbed.12804.
- Proell, Martina, Motti Gerlic, Peter D. Mace, John C. Reed, e Stefan J. Riedl. 2013. "The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling". *Biochemical Journal* 449(3). doi: 10.1042/BJ20121198.
- Rajashekara, Gireesh, Linda Eskra, Angie Mathison, Erik Petersen, Qiqi Yu, Jerome Harms, e Gary Splitter. 2006. "Brucella: functional genomics and host-pathogen interactions." *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 7(1–2).
- Rathinam, Vijay A. K., Sivapriya Kailasan Vanaja, e Katherine A. Fitzgerald. 2012. "Regulation of inflammasome signaling". *Nature Immunology* 13(4).
- Rogers, Corey, Teresa Fernandes-Alnemri, Lindsey Mayes, Diana Alnemri, Gino Cingolani, e Emad S. Alnemri. 2017. "Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death". *Nature Communications* 8. doi: 10.1038/ncomms14128.
- Roos, Wynand P., Adam D. Thomas, e Bernd Kaina. 2016. "DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology". *Nature Reviews Cancer* 16(1).
- Sagulenko, V., S. J. Thygesen, D. P. Sester, A. Idris, J. A. Cridland, P. R. Vajjhala, T. L. Roberts, K. Schroder, J. E. Vince, J. M. Hill, J. Silke, e K. J. Stacey. 2013. "AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC". *Cell Death and Differentiation* 20(9). doi: 10.1038/cdd.2013.37.
- Sangari, F. J., e J. Agüero. 1996. "Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update." *Microbiología (Madrid, Spain)* 12(2).
- Santos, Renato L., Telma M. Martins, Alan M. Borges, e Tatiane A. Paixão. 2013. "Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil". *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(6). doi: 10.1590/s0100-736x2013000600012.
- Sarhan, Joseph, Beiyun C. Liu, Hayley I. Muendlein, Peng Li, Rachael Nilson, Amy Y. Tang, Anthony Rongvaux, Stephen C. Bunnell, Feng Shao, Douglas R. Green, e Alexander Poltorak. 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(46). doi: 10.1073/pnas.1809548115.
- Sborgi, Lorenzo, Sebastian Rühl, Estefania Mulvihill, Joka Pipercevic, Rosalie Heilig, Henning Stahlberg, Christopher J. Farady, Daniel J. Müller, Petr Broz, e Sebastian Hiller. 2016. "GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death". *The EMBO Journal* 35(16). doi: 10.15252/embj.201694696.
- Schneider, Katharina S., Christina J. Groß, Roland F. Dreier, Benedikt S. Saller, Ritu Mishra, Oliver Gorka, Rosalie Heilig, Etienne Meunier, Mathias S. Dick, Tamara Ćiković, Jan Sodenkamp, Guillaume Médard, Ronald Naumann, Jürgen Ruland, Bernhard Kuster, Petr Broz, e Olaf Groß. 2017. "The Inflammasome Drives GSDMD-Independent Secondary

- Pyroptosis and IL-1 Release in the Absence of Caspase-1 Protease Activity". *Cell Reports* 21(13). doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.018.
- Schwarzer, Robin, Lucie Laurien, e Manolis Pasparakis. 2020. "New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8". *Current Opinion in Cell Biology* 63.
- Seleem, Mohamed N., Stephen M. Boyle, e Nammalwar Sriranganathan. 2008. "Brucella: A pathogen without classic virulence genes". *Veterinary Microbiology* 129(1–2).
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Kun Wang, Xuyan Shi, Yue Wang, Huanwei Huang, Yinghua Zhuang, Tao Cai, Fengchao Wang, e Feng Shao. 2015. "Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death". *Nature* 526(7575). doi: 10.1038/nature15514.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Yupeng Wang, Wenqing Gao, Jingjin Ding, Peng Li, Liyan Hu, e Feng Shao. 2014. "Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS". *Nature* 514(7521). doi: 10.1038/nature13683.
- Slee, Elizabeth A., Colin Adrain, e Seamus J. Martin. 2001. "Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis". *Journal of Biological Chemistry* 276(10). doi: 10.1074/jbc.M008363200.
- Sola, Marília Cristina, Fernanda Antunha Freitas, Eraldo Lourenço de Sousa Sena, e Albenones José Mesquita. 2014. "BRUCELOSE BOVINA: REVISÃO". *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer* 10(18).
- Solera, Javier. 2010. "Update on brucellosis: Therapeutic challenges". *International Journal of Antimicrobial Agents* 36(SUPPL. 1). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.015.
- Sollberger, Gabriel, Axel Choidas, Garth Lawrence Burn, Peter Habenberger, Raffaella Di Lucrezia, Susanne Kordes, Sascha Menninger, Jan Eickhoff, Peter Nussbaumer, Bert Klebl, Renate Krüger, Alf Herzig, e Arturo Zychlinsky. 2018. "Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps". *Science Immunology* 3(26). doi: 10.1126/sciimmunol.aar6689.
- Speir, Mary, Kate E. Lawlor, Stefan P. Glaser, Gilu Abraham, Seong Chow, Adam Vogrin, Keith E. Schulze, Ralf Schuelein, Lorraine A. O'Reilly, Kylie Mason, Elizabeth L. Hartland, Trevor Lithgow, Andreas Strasser, Guillaume Lessene, David C. S. Huang, James E. Vince, e Thomas Naderer. 2016. "Eliminating Legionella by inhibiting BCL-XL to induce macrophage apoptosis". *Nature Microbiology* 1(3). doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.34.
- Starr, Tregel, Robert Child, Tara D. Wehrly, Bryan Hansen, Seungmin Hwang, Carlos López-Otin, Herbert W. Virgin, e Jean Celli. 2012. "Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle". *Cell Host and Microbe* 11(1). doi: 10.1016/j.chom.2011.12.002.
- Starr, Tregel, Tony W. Ng, Tara D. Wehrly, Leigh A. Knodler, e Jean Celli. 2008. "Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment". *Traffic* 9(5). doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x.
- Stockinger, Silvia, Benjamin Reutterer, Barbara Schaljo, Carola Schellack, Sylvia Brunner, Tilo Materna, Masahiro Yamamoto, Shizuo Akira, Tadatsugu Taniguchi, Peter J. Murray, Mathias Müller, e Thomas Decker. 2004. "IFN Regulatory Factor 3-Dependent Induction of Type I IFNs by Intracellular Bacteria Is Mediated by a TLR- and Nod2-Independent Mechanism". *The Journal of Immunology* 173(12). doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7416.
- Su, Helen, Nicolas Bidère, Lixin Zheng, Alan Cubre, Keiko Sakai, Janet Dale, Leonardo Salmena, Razqallah Hakem, Stephen Straus, e Michael Lenardo. 2005. "Requirement for caspase-8 in NF- κ B activation by antigen receptor". *Science* 307(5714). doi: 10.1126/science.1104765.
- Sun, Lijun, Jiayi Wu, Fenghe Du, Xiang Chen, e Zhijian J. Chen. 2013. "Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway". *Science* 339(6121). doi: 10.1126/science.1232458.

- Taabazuig, Cornelius Y., Marian C. Okondo, e Daniel A. Bachovchin. 2017. "Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages". *Cell Chemical Biology* 24(4). doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.009.
- Takaoka, Akinori, Zhichao Wang, Myoung Kwon Choi, Hideyuki Yanai, Hideo Negishi, Tatsuma Ban, Yan Lu, Makoto Miyagishi, Tatsuhiko Kodama, Kenya Honda, Yusuke Ohba, e Tadatsugu Taniguchi. 2007. "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response". *Nature* 448(7152). doi: 10.1038/nature06013.
- Thornberry, Nancy A., Herbert G. Bull, Jimmy R. Calaycay, Kevin T. Chapman, Andrew D. Howard, Matthew J. Kostura, Douglas K. Miller, Susan M. Molineaux, Jeffrey R. Weidner, John Aunins, Keith O. Elliston, Julia M. Ayala, Francesca J. Casano, Jayne Chin, Gloria J. F. Ding, Linda A. Egger, Erin P. Gaffney, Guadalupe Limjuco, Oksana C. Palyha, S. M. Raju, Anna M. Rolando, J. Paul Salley, Ting-Ting Yamin, Terry D. Lee, John E. Shively, Malcolm MacCross, Richard A. Mumford, John A. Schmidt, e Michael J. Tocci. 1992. "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes". *Nature* 356(6372):768–74. doi: 10.1038/356768a0.
- Tsuchiya, Kohsuke, e Hideki Hara. 2014. "The inflammasome and its regulation". *Critical Reviews in Immunology* 34(1).
- Tsuchiya, Kohsuke, Shinsuke Nakajima, Shoko Hosojima, Dinh Thi Nguyen, Tsuyoshi Hattori, Thuong Manh Le, Osamu Hori, Mamunur Rashid Mahib, Yoshifumi Yamaguchi, Masayuki Miura, Takeshi Kinoshita, Hiroko Kushiyama, Mayumi Sakurai, Toshihiko Shiroishi, e Takashi Suda. 2019. "Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D". *Nature Communications* 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-09753-2.
- Tummers, Bart, e Douglas R. Green. 2017. "Caspase-8: regulating life and death". *Immunological Reviews* 277(1).
- Vajjhala, Parimala R., Alvin Lu, Darren L. Brown, Siew Wai Pang, Vitaliya Sagulenko, David P. Sester, Simon O. Cridland, Justine M. Hill, Kate Schroder, Jennifer L. Stow, Hao Wu, e Katryn J. Stacey. 2015. "The inflammasome adaptor ASC induces procaspase-8 death effector domain filaments". *Journal of Biological Chemistry* 290(49). doi: 10.1074/jbc.M115.687731.
- Viadas, Cristina, María C. Rodríguez, Felix J. Sangari, Jean Pierre Gorvel, Juan M. García-Lobo, e Ignacio López-Goñi. 2010. "Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system". *PLoS ONE* 5(4). doi: 10.1371/journal.pone.0010216.
- Vitale, Ilio, Gwenola Manic, Ruggero De Maria, Guido Kroemer, e Lorenzo Galluzzi. 2017. "DNA Damage in Stem Cells". *Molecular Cell* 66(3).
- Weng, Dan, Robyn Marty-Roix, Sandhya Ganesan, Megan K. Proulx, Gregory I. Vladimer, William J. Kaiser, Edward S. Mocarski, Kimberly Pouliot, Francis Ka Ming Chan, Michelle A. Kelliher, Phillip A. Harris, John Bertin, Peter J. Gough, Dmitry M. Shayakhmetov, Jon D. Goguen, Katherine A. Fitzgerald, Neal Silverman, e Egil Lien. 2014. "Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(20). doi: 10.1073/pnas.1403477111.
- Wilson, Nicholas S., Vishva Dixit, e Avi Ashkenazi. 2009. "Death receptor signal transducers: Nodes of coordination in immune signaling networks". *Nature Immunology* 10(4).
- Xia, Bingqing, Sui Fang, Xueqin Chen, Hong Hu, Peiyuan Chen, Huayi Wang, e Zhaobing Gao. 2016. "MLKL forms cation channels". *Cell Research* 26(5). doi: 10.1038/cr.2016.26.
- Yang, Xiaolu, Howard Y. Chang, e David Baltimore. 1998. "Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization". *Molecular Cell* 1(2). doi: 10.1016/S1097-2765(00)80032-5.

9. Anexos

9.1 Artigos publicados durante o período do doutorado

- Alonso Paiva, Iván M., Raiany A. Santos, Camila B. Brito, Mariana C. Ferrero, Juan Manuel Ortiz Wilczyński, Eugenio A. Carrera Silva, Sergio C. Oliveira, e Pablo C. Baldi. 2023. “Role of the cGAS/STING pathway in the control of *Brucella abortus* infection acquired through the respiratory route”. *Frontiers in Immunology* 14. doi: 10.3389/fimmu.2023.1116811.
- Rungue, Marcella, Victor Melo, David Martins, Priscila C. Campos, Gabriela Leles, Izabela Galvão, Viviani Mendes, Mariana Aganetti, Ágatha Pedersen, Natan R. G. Assis, Raiany Santos, Geovanni D. Cassali, Ana Lúcia B. Godard, Flaviano S. Martins, Sergio C. Oliveira, e Angélica T. Vieira. 2021. “Nlrp6-associated host microbiota composition impacts in the intestinal barrier to systemic dissemination of *brucella abortus*”. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15(2). doi: 10.1371/journal.pntd.0009171.
- Santos, Raiany, Priscila C. Campos, Marcella Rungue, Victor Rocha, David Santos, Viviani Mendes, Fabio V. Marinho, Flaviano Martins, Mayra F. Ricci, Diego C. Dos Reis, Geovanni D. Cassali, José Carlos Alves-Filho, Angelica T. Vieira, e Sergio C. Oliveira. 2020. “The role of ST2 receptor in the regulation of *Brucella abortus* oral infection”. *Pathogens* 9(5). doi: 10.3390/pathogens9050328.

9.2 Artigo Principal gerado a partir deste trabalho (em anexo)

- Santos, Raiany A., Daiane M. Cerqueira, Dario S. Zamboni, e Sergio C. Oliveira. 2022. “Caspase-8 but not caspase-7 influences inflammasome activation to act in control of *Brucella abortus* infection”. *Frontiers in Microbiology* 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.1086925.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Axel Cloeckaert,
Institut National de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et
l'environnement (INRAE), France

REVIEWED BY

Clayton Caswell,
Virginia Tech,
United States
Juan Esteban Ugalde,
Universidad Nacional de San Martin,
Argentina
Gary Splitter,
University of Wisconsin-Madison,
United States

*CORRESPONDENCE

Sergio C. Oliveira
scozeus@icb.ufmg.br

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 01 November 2022

ACCEPTED 15 November 2022

PUBLISHED 01 December 2022

CITATION

Santos RA, Cerqueira DM, Zamboni DS and
Oliveira SC (2022) Caspase-8 but not
caspase-7 influences inflammasome
activation to act in control of *Brucella*
abortus infection.
Front. Microbiol. 13:1086925.
doi: 10.3389/fmicb.2022.1086925

COPYRIGHT

© 2022 Santos, Cerqueira, Zamboni and
Oliveira. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Caspase-8 but not caspase-7 influences inflammasome activation to act in control of *Brucella abortus* infection

Raiany A. Santos¹, Daiane M. Cerqueira², Dario S. Zamboni³
and Sergio C. Oliveira^{1,2,4*}

¹Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ³Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁴ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Programmed cell death (PCD) is an important mechanism of innate immunity against bacterial pathogens. The innate immune PCD pathway involves the molecules caspase-7 and caspase-8, among others. *Brucella abortus* is a gram-negative bacterium that causes a zoonotic disease termed brucellosis. The innate immune response against this pathogen involves activation of inflammasome components and induction of pyroptosis. However, no studies so far have revealed the role of caspase-7 or caspase-8 during this bacterial infection. Herein, we demonstrate that caspase-7 is dispensable for caspase-1 processing, IL-1 β secretion and cell death in macrophages. Additionally, caspase-7 deficient animals control *B. abortus* infection as well as the wild type mice. Furthermore, we addressed the role of caspase-8 in inflammasome activation and pyroptosis during this bacterial infection. Macrophages deficient in caspase-8 secreted reduced amounts of IL-1 β that parallels with diminished caspase-1 activity when compared to wild type cells. Additionally, caspase-8 KO macrophages showed reduced LDH release when compared to wild type, suggesting that caspase-8 may play an important role in pyroptosis in response to *B. abortus*. Finally, caspase-8 KO animals were more susceptible to *Brucella* infection when compared to wild type mice. Overall, this study contributes to a better understanding of the involvement of caspase-7 and caspase-8 in innate immunity against *B. abortus* infection.

KEYWORDS

caspase-8, caspase-7, *Brucella abortus*, inflammasome, pyroptosis, innate immunity

Introduction

Brucellosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Brucella* of worldwide distribution. Great advance has been made in the control of brucellosis in recent years. However, in many regions of the world, *Brucella* infection in domestic animals still persists, leading to frequent transmission to the human population. In regions such as the

Mediterranean countries of Europe, like Portugal, Italy and Greece, brucellosis is still considered an important human disease and it is often neglected (Corbel, 1997).

Innate immunity is an important arm of the immune system involved in the control of *Brucella* infection. In previous studies performed by our research group, we demonstrated that receptors and adaptor molecules such as TLR9, AIM2, MyD88, and STING are important components in the protective response against *Brucella* infection (Macedo et al., 2008; Gomes et al., 2016; Costa Franco et al., 2018, 2019). In addition, we and others have shown that pyroptosis triggered upon activation of inflammasomes, is also an important mechanism in restricting *in vivo* infection against *Brucella abortus* (Cerqueira et al., 2018; Lacey et al., 2018). In recent study, we showed that caspase-11/GSDMD-dependent pyroptosis process triggered by *B. abortus* contributed to the restriction of infection *in vivo* by assisting in the recruitment and activation of immune cells such as neutrophils, macrophages, and dendritic cells (Cerqueira et al., 2018).

Programmed cell death (PCD) is a intricate circuit that involves the cross-talk among different caspases, and their substrates. Caspase-3 and caspase-7 are considered executioner molecules triggering host cell apoptosis (Kim et al., 2005). Recent study demonstrated that *Brucella* inhibited the PCD in early stage of infection to allow bacterial replication in host cells and promoted apoptosis in the later stage during infection in macrophages (Zhang et al., 2022). In the literature, there are some controversies in the role of caspase-7 during bacterial infections. Caspase-7 has been implicated in resistance to *L. pneumophila* through the NLRC4 inflammasome (Akhter et al., 2009). In contrast, Gonçalves et al. (Goncalves et al., 2019) demonstrated that mice with a single deletion in caspase-7 are not fully susceptible to *L. pneumophila*. The *Casp7^{-/-}* did not phenocopy the susceptibility to *L. pneumophila* infection as observed in *Nlrc4^{-/-}* animals.

Caspase-8, early on classified as an apoptotic caspase, has lately been shown to have a role in several inflammatory processes. Caspase-8 is involved in the inflammasome pathway and can be activated by NLRP3, AIM2 and NLRC4 in macrophages (Man et al., 2013; Sagulenko et al., 2013) and NLRP3 inflammasome in dendritic cells (Antonopoulos et al., 2015). Caspase-8 can act by controlling NF- κ B signaling, influencing the positive regulation of components of the inflammasome, such as the NLRP3 and pro-IL-1 β (Weng et al., 2014). It can also activate the inflammasome pathway in response to *C. albicans* β -glucans (Ganesan et al., 2014). Interestingly, upon TLR or death receptor activation, active caspase-8 can cleave the IL-1 β precursor into its bioactive fragment at the same site as caspase-1 (Shenderov et al., 2014), and can directly cleave GSDMD into its N-terminal fragment, triggering pyroptosis during *Yersinia* infection (Sarhan et al., 2018). In addition, once the inflammasome is activated, but pyroptosis is impaired, caspase-8 can act leading to a cell death program. This has been demonstrated in studies with intracellular bacteria such as *L. pneumophila* and *S. Typhimurium* in the absence of caspase-1 or GSDMD (Mascarenhas et al., 2017; Lee et al., 2018).

To the best of our knowledge, the role of caspase-7 and caspase-8 in *Brucella* infection has not been addressed so far. Therefore, in order to expand the understanding of the mechanisms involved in the innate immune response and inflammatory cell death, we investigated the participation of the caspase-7 and caspase-8 molecules during *B. abortus* infection.

Materials and methods

Mice

Wild-type C57BL/6 (WT) mice were purchased from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and, *Casp7^{-/-}*, *Casp7/11^{-/-}*, *Casp7/Gsdmd^{-/-}*, *Gsdmd^{-/-}*, *Casp8^{+/+}/RIPK3^{-/-}*, and *Casp8/RIPK3^{-/-}* were kindly provided by Dr. Dario Simões Zamboni, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil. Genetically deficient and control mice were maintained at our facilities and used at 6–8 weeks of age. Mice were housed in filter top cages and provided with sterile water and food *ad libitum*. Groups of 5–7 animals were used to perform all experiments. The procedures for animal experimentation were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais-CEUA/UFMG under protocol number 69/2020.

Bacteria and culture conditions

Brucella abortus virulent strain 2,308 was used in this study. To prepare the inoculum, the bacteria were grown in BB (*Brucella Broth*) medium (BD Biosciences, United States) for 24 h at 37°C under 180 rpm shaking, washed in PBS for 10 min, 5,000 rpm at 4°C, and resuspended in sterile PBS. The OD of the culture was measured at 600 nm in a spectrophotometer to determine the bacterial number in the solution.

Mice infection with *Brucella abortus*

Five to seven mice from each group were infected intraperitoneally (i.p.) with 1×10^6 *B. abortus* in 100 μ l of PBS and the animals sacrificed at 14 days post-infection. The spleens were harvested and macerated in 10 ml saline (NaCl 0.9%), serially diluted, and plated in duplicated on *Brucella Broth* agar. Plates were incubated for 3 days at 37°C and the CFU number was determined.

Bone marrow-derived macrophages

BMDMs were differentiated *in vitro* from bone marrow cells extracted from mouse femurs. Cultures were differentiated for

7 days in an incubator at 37°C, 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 1% HEPES, 20% fetal bovine serum (FBS), 30% L929 cell-conditioned medium (LCCM) source of M-CSF (important for differentiation of progenitor cells into macrophages), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Thermo Fischer Scientific). After differentiation, macrophages were collected by washing the monolayers with ice-cold PBS, distributed on culture plates, and cultured in DMEM medium containing 1% SFB and 1% HEPES or 10% SFB and 1% HEPES and they were ready for use.

Lactate dehydrogenase release assay

For the lactate dehydrogenase (LDH) release assay, BMDMs were plated at 5×10^5 cells/well in 24-well plates and infected with *B. abortus* (MOI 100) for 8 h. RPMI 1640 medium without phenol red, with 1% glutamine, 1% FBS was used. Supernatants were collected, and LDH was quantified using the Cytotox96 LDH kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. During infection, bacteria were opsonized with a polyclonal mouse antibody (anti-*B. abortus*, dilution 1:1,000) to ensure more efficient bacterial phagocytosis. This polyclonal antibody was generated by injecting 1×10^6 heat-killed bacteria/mouse. The animals were injected three times during a 15-day interval, and after this period, serum from each mouse was tested for the presence of the specific antibody and stored at -80°C.

Cytokine measurement

For cytokine determination, BMDMs were plated at a concentration of 5×10^5 cells/well in 24-well plates and the cells were infected with *B. abortus* at an MOI of 100 for 17 h. Supernatants were collected and cytokines were measured with the mouse IL-1β, ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

BMDMs were cultured at 5×10^5 cells/well in 24-well plates. The cells were infected with *B. abortus* for 17 h as described above. After 17 h of infection, culture supernatants were harvested and cells were lysed with M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1:100 protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich). Cell lysates and supernatants were subjected to SDS-PAGE analysis as already described in previous studies by our research group (Cerqueira et al., 2018). The primary Abs used included a mouse monoclonal against the p20 subunit of caspase-1 (Adipogen, San Diego, CA, United States) at a dilution of 1:1,000. Loading control was performed using anti-β-actin mAb (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) at a dilution of 1:1,000.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). The unpaired Student *t*-test was used to compare two groups. One-way ANOVA followed by multiple comparisons according to Tukey procedure was used to compare three or more groups. Unless otherwise stated, data are expressed as the mean ± SD. Differences were considered statistically significant at a *p*-value < 0.05.

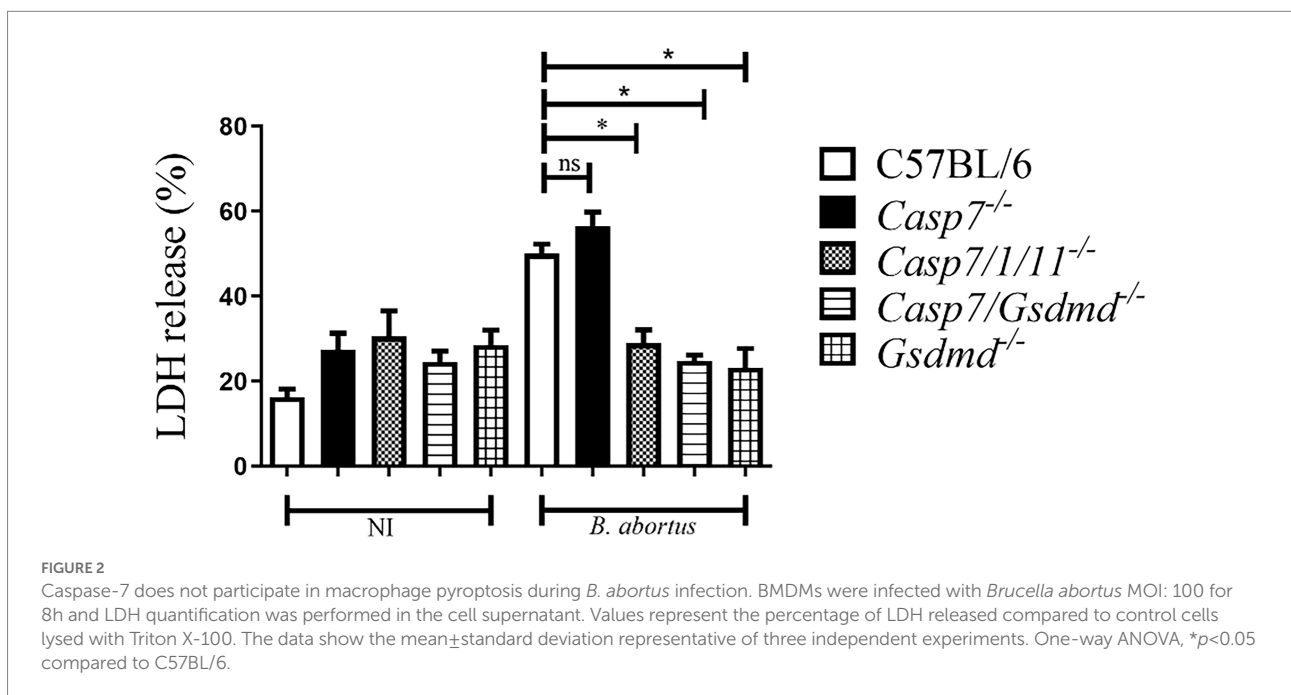
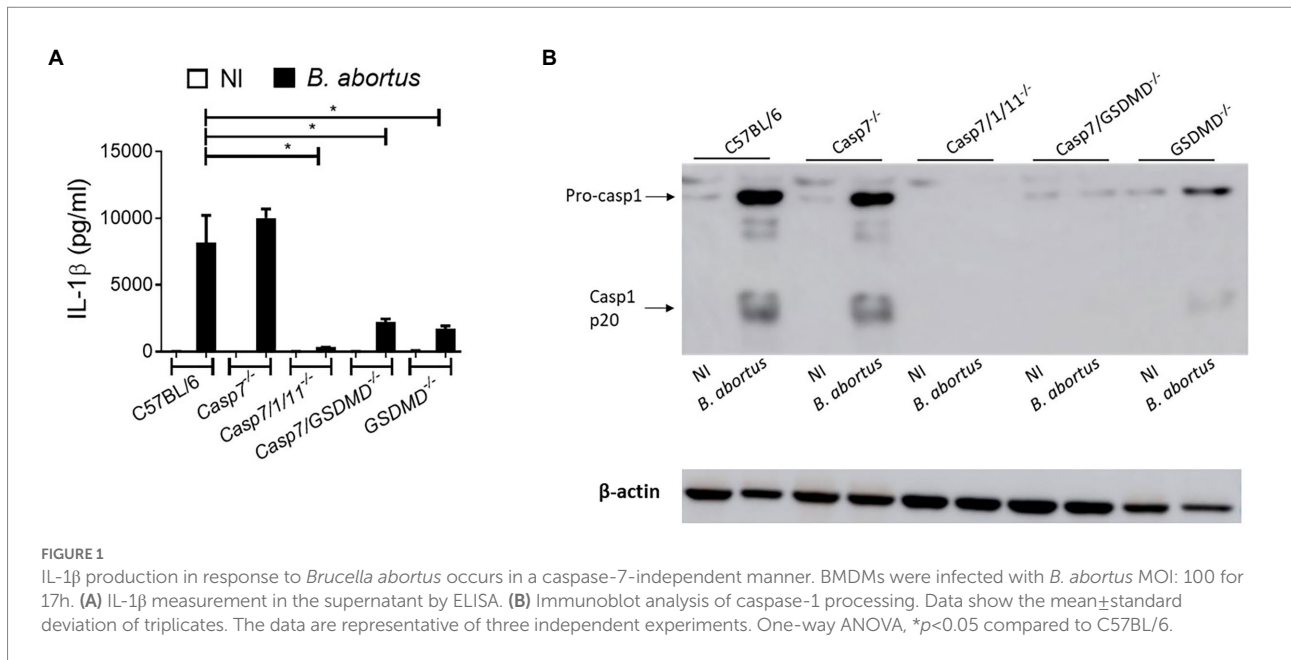
Results

IL-1β secretion in response to *Brucella abortus* occurs in a caspase-7-independent manner

The classical executioner caspases (caspase-7 and -3) are activated to initiate the process that culminate in the classical cell death signals (Nagata, 2018). Previous studies demonstrate that caspase-7 activation requires caspase-1 processing under inflammatory conditions (Lamkanfi and Kanneganti, 2010). To investigate whether caspase-7 participates in caspase-1 cleavage and IL-1β secretion during *Brucella abortus* infection, we infected BMDMs of C57BL/6 (WT), *Casp7*^{-/-}, *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-}, and *Gsdmd*^{-/-} with *Brucella*. After 17 h of infection, we evaluated IL-1β secretion in the supernatant of the cells (Figure 1A) and the lysate was properly prepared for the assay of caspase-1 processing by Western blot analysis (Figure 1B). In all assays, C57BL/6 and *Gsdmd*^{-/-} animals were used as controls, since the importance of gasdermin-D (GSDMD) for the control of *B. abortus* infection had been demonstrated previously by our research group (Cerqueira et al., 2018). We observed that BMDMs from *Casp7*^{-/-} mice secreted similar amounts of IL-1β as WT animals. In macrophages from *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-}, and *Gsdmd*^{-/-} animals the amount of IL-1β secreted was dramatically reduced compared to C57BL/6. Caspase-1 cleavage was observed only in the C57BL/6 and *Casp7*^{-/-} strains, corroborating with the IL-1β cytokine secretion profile. Collectively, these data suggest that caspase-7 has no significant impact in IL-1β secretion and caspase-1 cleavage in response to *B. abortus* infection.

Caspase-7 does not participate in macrophage pyroptosis during *Brucella abortus* infection

Next, we addressed the role of caspase-7 in *B. abortus* induced cell death by quantifying LDH release in cell culture supernatants (Figure 2). BMDMs from C57BL/6, *Casp7*^{-/-}, *Casp7/1/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-}, and *Gsdmd*^{-/-} mice were infected with *B. abortus* and after 8 h of infection, LDH was quantified in the supernatant. *B. abortus* infection triggered higher LDH release in BMDMs of C57BL/6 and *Casp7*^{-/-} strains when compared to *Casp7/1/11*^{-/-},



Casp7/Gsdmd^{-/-}, and *Gsdmd*^{-/-} cells. This finding suggests that caspase-7 does not have a role in the induction of programmed cell death in response to *B. abortus* infection.

Caspase-7 plays no role in *Brucella abortus* infection in vivo

To determine whether the absence of caspase-7 influences the control of *Brucella* infection in vivo, we infected C57BL/6,

Casp7^{-/-}, *Casp7/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-}, and *Gsdmd*^{-/-} mouse strains intraperitoneally and after 2 weeks the animals were sacrificed and the spleens were removed for quantification of the number of bacterial CFU. As shown in Figure 3, the bacterial burden measured in *Casp7*^{-/-} animals showed no difference compared to the C57BL/6 controls. Higher bacterial numbers were observed in *Casp7/11*^{-/-}, *Casp7/Gsdmd*^{-/-}, and *Gsdmd*^{-/-} mice. This result demonstrates that this susceptibility profile to infection occurred not because the lack of caspase-7, but rather, because of the deletion of *Casp1/11* or *Gsdmd*.

Caspase-8 participates in caspase-1 cleavage and IL-1 β secretion in response to *Brucella abortus*

Further, we addressed the role of caspase-8 in regulating the inflammatory response during *B. abortus* infection. Deletion of caspase-8 results in RIPK3-dependent embryonic

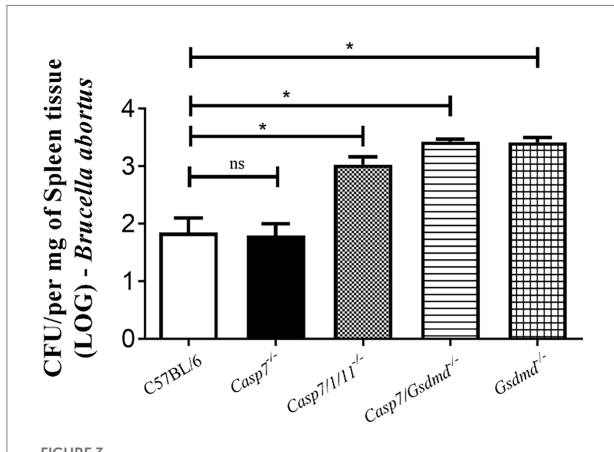


FIGURE 3

The role of caspase-7 in controlling *Brucella abortus* infection *in vivo*. Mice were infected intraperitoneally with 1×10^6 CFU of *B. abortus* and sacrificed after 2 weeks of infection, and spleen homogenates were seeded onto plates containing BB agar medium for CFU determination. Data shown are the mean \pm standard deviation of five mice/group. The data are representative of three independent experiments. One-way ANOVA, * $p < 0.05$, compared to wild-type mice.

lethality. To rescue this viability, additional deletion of the RIPK3 kinase *via* the CRISPR/Cas9 technique was required (Wang et al., 2013). Therefore, the animals used in this study deficient for caspase-8 possess the additional deletion of RIPK3. We infected BMDMs of C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, *Casp8/RIPK3*^{-/-}, and *Casp8^{+/+}/RIPK3^{-/-}* mouse strains with *B. abortus*, and after 17 h of infection, we evaluated the secretion of IL-1 β in the supernatant of the cells. Additionally, cell lysates were properly prepared for caspase-1 processing by Western blot analysis. BMDMs of *Casp8/RIPK3*^{-/-} secreted reduced amounts of IL-1 β compared to the WT and *Casp8^{+/+}/RIPK3^{-/-}* controls, similar to the profile observed in *Gsdmd*^{-/-} macrophages (Figure 4A). Further, the immunoblot data corroborate with the IL-1 β secretion profile, where caspase-1 cleavage was detected only in the C57BL/6 and *Casp8^{+/+}/RIPK3^{-/-}* cells (Figure 4B). These data suggest an important role of caspase-8 in caspase-1 cleavage and consequent IL-1 β secretion during *B. abortus* infection.

Lack of caspase-8 interferes with cell death induced by *Brucella abortus* infection

Our results demonstrate that caspase-8 influences inflammasome activation induced by *Brucella*, since caspase-1 activation and IL-1 β secretion occurs in a caspase-8-dependent manner. Thus, we sought to investigate whether caspase-8 is involved in pyroptosis induced by *B. abortus*. Macrophages from

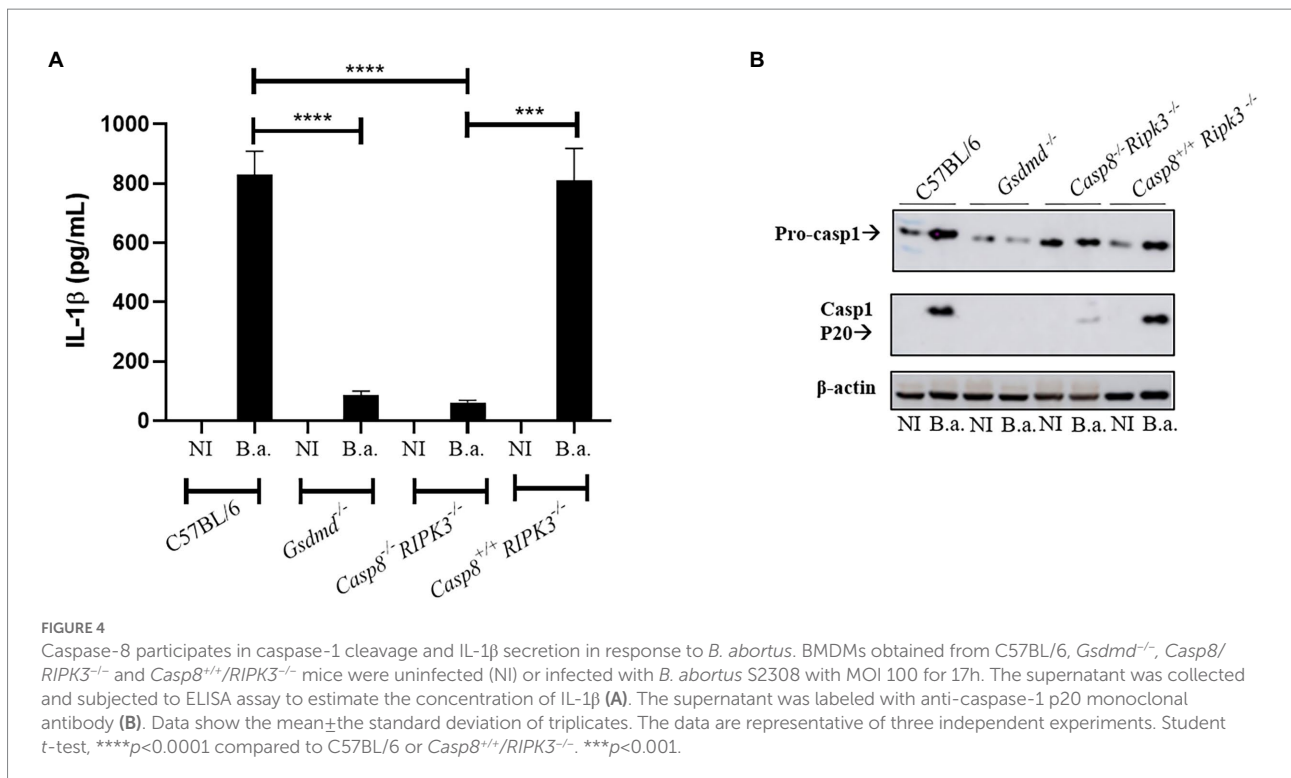


FIGURE 4

Caspase-8 participates in caspase-1 cleavage and IL-1 β secretion in response to *B. abortus*. BMDMs obtained from C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, *Casp8/RIPK3*^{-/-} and *Casp8^{+/+}/RIPK3^{-/-}* mice were uninfected (NI) or infected with *B. abortus* S2308 with MOI 100 for 17h. The supernatant was collected and subjected to ELISA assay to estimate the concentration of IL-1 β (A). The supernatant was labeled with anti-caspase-1 p20 monoclonal antibody (B). Data show the mean \pm the standard deviation of triplicates. The data are representative of three independent experiments. Student *t*-test, **** $p < 0.0001$ compared to C57BL/6 or *Casp8^{+/+}/RIPK3^{-/-}*, *** $p < 0.001$.

C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, and *Casp8/RIPK3*^{-/-} strains were infected with *B.abortus* for 8h. After this period, we performed the quantification of LDH release in cell culture supernatants (Figure 5). LDH release was greatly reduced in cells from animals deficient for caspase-8 and GSDMD, suggesting a potential role of caspase-8 in the induction of cell death in response to *B.abortus*.

Absence of caspase-8 enhances susceptibility to *Brucella abortus* infection *in vivo*

Since BMDMs deficient in caspase-8 showed reduced caspase-1 activation and secretion of IL-1 β levels, we finally evaluated whether caspase-8 also played a role in restricting *Brucella* infection in mice. First, C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-}, and *Casp8/RIPK3*^{-/-} mice were infected intraperitoneally with *B. abortus*. After 2 weeks of infection, bacterial colony forming units (CFU) were determined from spleen homogenates. The recovery of

bacteria in the spleen of *Casp8/RIPK3*^{-/-} animals was higher than the WT control group, in a manner very similar to that observed in *Gsdmd*^{-/-} animals (Figure 6). Collectively, these data suggest that caspase-8 is involved in an inflammatory response and in the control of *B. abortus in vivo*.

Discussion

Programmed cell death (PCD) can be activated in response to different stimuli (Nagata, 2018). Apoptosis, necroptosis and pyroptosis are three types of cell death that have major involvement in immune response and disease control (Schwarzer et al., 2020). Apoptosis helps in the destruction and removal of infected cells during bacterial infections (Speir et al., 2016). In the case of *Brucella*, some studies have already established that a virulent strain inhibits cell death in macrophages to allow bacterial replication (Chen et al., 2011). In contrast, in dendritic cells, astrocytes and T lymphocytes, the smooth strain induced apoptotic cell death (Garcia Samartino et al., 2010; Velasquez et al., 2012). Caspase-7, like caspase-3, is an executing caspase, both of which are activated by caspases-8 and -9 during death receptor-induced apoptosis, under certain conditions (Lamkanfi et al., 2002). Recently, some studies show that caspase-7 has a distinct role from caspase-3 during activation of apoptosis and also has a role in the inflammatory response against bacterial pathogens (Slee et al., 2001). Studies using *Salmonella typhimurium* infection of macrophages or cells stimulated with LPS and ATP, showed that caspase-7 activation was caspase-1-dependent.

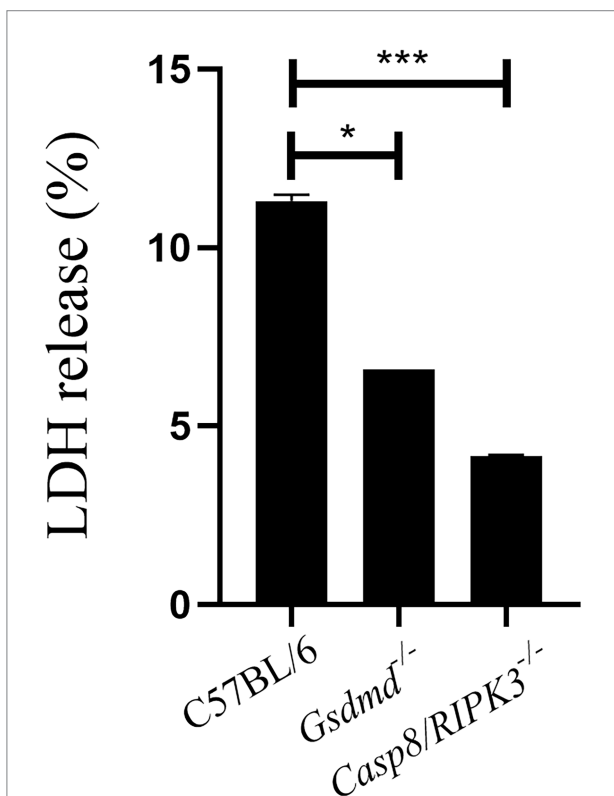


FIGURE 5
Caspase-8 is important to induce cell death during *B.abortus* infection. BMDMs of C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} and *Casp8/RIPK3*^{-/-} were infected with *B. abortus* with MOI 100 for 8hs and LDH quantification was performed in the cell supernatant. Values represent the percentage of LDH released compared to control cells lysed with Triton X-100. Data show the mean \pm the representative standard deviation of triplicates. The data are representative of three independent experiments. Student t-test, * p <0.05, *** p <0.001 compared to C57BL/6.

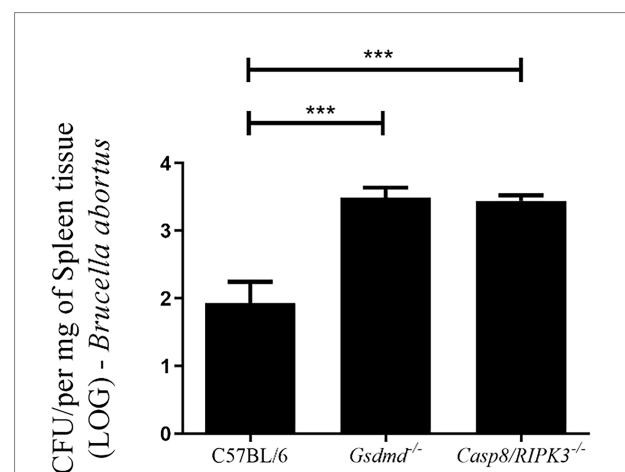


FIGURE 6
Caspase-8 influences the resistance to *Brucella* infection *in vivo*. C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} and *Casp8/RIPK3*^{-/-} mice were infected intraperitoneally with 1×10^6 CFU of *B. abortus*. Animals were sacrificed 2weeks after infection and diluted spleen homogenates were plated on agar plates containing BB medium for CFU determination. Data shown are the mean \pm standard deviation of five mice/group. The graph is representative of three independent experiments. One-way ANOVA, *** p <0.001 compared to C57BL/6.

Additionally, Akhter et al. have observed in the absence of caspase-7 impaired ability of macrophages to restrict intracellular replication of *Legionella pneumophila* (Akhter et al., 2009). In contrast, Gonçalves et al. (Goncalves et al., 2019) demonstrated that lack of caspase-7 is not required to control *L. pneumophila* replication *in vitro* and *in vivo*. In another study, using an *in vivo* septic shock model, caspase-7-deficient mice were shown to be resistant to lethality induced by intraperitoneal injections of LPS (Lamkanfi et al., 2009). However, in our study caspase-7 does not appear to participate in the control of *B. abortus* infection. Inflammasome activation with cleavage of caspase-1 and secretion of IL-1 β is not affected in the absence of caspase-7, as well as induction of cell death and *in vivo* susceptibility to infection. We have previously shown the participation of caspase-1, caspase-11 and GSDMD in controlling *B. abortus* (Cerqueira et al., 2018). Therefore, susceptibility to *Brucella* infection observed in *Casp7/1/11*^{-/-} and *Casp7/Gsdmd*^{-/-} animals is not due to lack of caspase-7 but rather the absence of caspase-1/11 and GSDMD.

Necroptosis is a programmed cell death pathway, with inflammatory features, that involves the kinases RIPK1 and RIPK3 and the pore-forming pseudokinase MLKL. When RIPK3 is phosphorylated, oligomerization of MLKL is initiated and subsequently inserts into the plasma membrane of the cell, leading to pore formation and cell rupture (Tummers and Green, 2017). Caspase-8 is involved in apoptosis and pyroptosis mechanisms of cell death, and when caspase-8 is inhibited RIPK1 interacts with RIPK3 leading to necroptosis (Pandian and Kanneganti, 2022). Pyroptosis is another type of inflammatory programmed cell death triggered by inflammasome activation, and for a long time, it was considered to be caspase-1-mediated in response to bacterial challenge. However, when caspase-11 was shown to detect intracellular LPS and also serve as a trigger to pyroptosis, the role of pyroptosis expanded widely (Kayagaki et al., 2011). Herein, we observed that in WT infected cells LDH release occurs, corroborating with data from our previous study where we showed that *B. abortus* infection triggers pyroptosis, and this phenomenon is GSDMD-dependent (Cerqueira et al., 2018). Additionally, in this study, we demonstrated that cell death induced by *Brucella* was also shown to be caspase-8-dependent. Caspase-8 contributes to activation of canonical and noncanonical inflammasomes. During *Salmonella* infection, caspase-8 can be recruited to the NLRC4 inflammasome regulating IL-1 β secretion, but not playing a role in cell death (Man et al., 2013). In contrast, in *Yersinia* infection model, like we observed in this study, caspase-8 activates GSDMD to induce cell death (Sarhan et al., 2018). Furthermore, we observed here that mice deficient for caspase-8 and GSDMD are more susceptible to *Brucella* infection *in vivo* compared to wild type animals, suggesting that pyroptosis triggered during *B. abortus* infection is an important mechanism to control infection.

Several studies have already identified cellular functions for the GSDMD-mediated pore, such as secretion of molecules such as IL-1 β and IL-1 α and eicosanoids, which are important for recruiting neutrophils to the site of infection and promoting phagocytosis of infected cells and contributing to infection restriction (Jorgensen et al., 2016). Herein, reduced IL-1 β secretion and pyroptosis observed in *Casp8/RIPK3*^{-/-} mice are possible mechanisms that may contribute to increased susceptibility to infection. Although we did not investigate cell recruitment in this study, we hypothesize that innate cells recruitment to the site of infection may be impaired by the absence of pyroptosis in caspase-8 deficient animals, which could in part explain the increased bacterial load observed in these animals. Recently, caspase-8 was involved in *Aspergillus fumigatus* keratitis being critical in the recruitment of inflammatory cells and the clearance of the fungus (Wang et al., 2022). In summary, we suggest that caspase-8 plays an important role in cell death induced during *B. abortus* infection, contributing to inflammation and infection control in mice.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the procedures for animal experimentation were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais-CEUA/UFMG under protocol number 69/2020.

Author contributions

RS performed all the experiments and wrote the manuscript. DC participated in the design of this study, provided assistance with data acquisition, data analysis, and statistical analysis. DZ participated in the design of this study and provided reagents to perform the experiments. SO participated in the design of this study, provided assistance with data acquisition and wrote and reviewed the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to SO (CNPq, www.cnpq.br; grant# 303044/2020-9), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais to SO (FAPEMIG, www.fapemig.br; grants# APQ #01945/17 and Rede Mineira de

Imunobiológicos #00140-16), National Institutes of Health to SO (NIH, www.nih.gov; grant# R01 AI116453).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Akhter, A., Gavrilin, M. A., Frantz, L., Washington, S., Ditty, C., Limoli, D., et al. (2009). Caspase-7 activation by the NlrC 4/Ipaf inflammasome restricts legionella pneumophila infection. *PLoS Pathog.* 5:e1000361. doi: 10.1371/journal.ppat.1000361
- Antonopoulos, C., Russo, H. M., El Sanadi, C., Martin, B. N., Li, X., Kaiser, W. J., et al. (2015). Caspase-8 as an effector and regulator of NLRP3 Inflammasome signaling. *J. Biol. Chem.* 290, 20167–20184. doi: 10.1074/jbc.M115.652321
- Cerqueira, D. M., Gomes, M. T. R., Silva, A. L. N., Rungue, M., Assis, N. R. G., Guimaraes, E. S., et al. (2018). Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection. *PLoS Pathog.* 14:e1007519. doi: 10.1371/journal.ppat.1007519
- Chen, F., Ding, X., Ding, Y., Xiang, Z., Li, X., Ghosh, D., et al. (2011). Proinflammatory caspase-2-mediated macrophage cell death induced by a rough attenuated *Brucella suis* strain. *Infect. Immun.* 79, 2460–2469. doi: 10.1128/IAI.00050-11
- Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213–221. doi: 10.3201/eid0302.970219
- Costa Franco, M. M. S., Marim, F. M., Alves-Silva, J., Cerqueira, D., Rungue, M., Tavares, I. P., et al. (2019). *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. doi: 10.4049/jimmunol.1700725
- Costa Franco, M. M., Marim, F., Guimaraes, E. S., Assis, N. R. G., Cerqueira, D. M., Alves-Silva, J., et al. (2014). Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor 3-driven IL-1 β production in response to beta-glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans*. *J. Immunol.* 193, 2519–2530. doi: 10.4049/jimmunol.1400276
- Garcia Samartino, C., Delpino, M. V., Pott Godoy, C., Di Genaro, M. S., Pasquevich, K. A., Zwerdling, A., et al. (2010). *Brucella abortus* induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis. *Am. J. Pathol.* 176, 1323–1338. doi: 10.2353/ajpath.2010.090503
- Gomes, M. T., Campos, P. C., Pereira Gde, S., Bartholomeu, D. C., Splitter, G., and Oliveira, S. C. (2016). TLR9 is required for MAPK/NF- κ B activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. *J. Leukoc. Biol.* 99, 771–780. doi: 10.1189/jlb.4A0815-346R
- Goncalves, A. V., Margolis, S. R., Quirino, G. F. S., Mascarenhas, D. P. A., Rauch, I., Nichols, R. D., et al. (2019). Gasdermin-D and Caspase-7 are the key Caspase-1/8 substrates downstream of the NAIP5/NLRC4 inflammasome required for restriction of legionella pneumophila. *PLoS Pathog.* 15:e1007886. doi: 10.1371/journal.ppat.1007886
- Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B. A., and Miao, E. A. (2016). Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *J. Exp. Med.* 213, 2113–2128. doi: 10.1084/jem.20151613
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., et al. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479, 117–121. doi: 10.1038/nature10558
- Kim, H. E., Du, F., Fang, M., and Wang, X. (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17545–17550. doi: 10.1073/pnas.0507900102
- Lacey, C. A., Mitchell, W. J., Dadelahi, A. S., and Skyberg, J. A. (2018). Caspase-1 and Caspase-11 mediate Pyroptosis, inflammation, and control of *Brucella* joint infection. *Infect. Immun.* 86, e00361–18. doi: 10.1128/IAI.00361-18
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* 9, 358–361. doi: 10.1038/sj.cdd.4400989
- Lamkanfi, M., and Kanneganti, T. D. (2010). Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 21–24. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.013
- Lamkanfi, M., Moreira, L. O., Makena, P., Spierings, D. C., Boyd, K., Murray, P. J., et al. (2009). Caspase-7 deficiency protects from endotoxin-induced lymphocyte apoptosis and improves survival. *Blood* 113, 2742–2745. doi: 10.1182/blood-2008-09-178038
- Lee, B. L., Mirrashidi, K. M., Stowe, I. B., Kummerfeld, S. K., Watanabe, C., Haley, B., et al. (2018). ASC- and caspase-8-dependent apoptotic pathway diverges from the NLRC4 inflammasome in macrophages. *Sci. Rep.* 8:3788. doi: 10.1038/s41598-018-21998-3
- Macedo, G. C., Magnani, D. M., Carvalho, N. B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R. T., and 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. doi: 10.4049/jimmunol.180.2.1080
- Man, S. M., Tourlomousis, P., Hopkins, L., Monie, T. P., Fitzgerald, K. A., and Bryant, C. E. (2013). Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1 β production. *J. Immunol.* 191, 5239–5246. doi: 10.4049/jimmunol.1301581
- Mascarenhas, D. P. A., Cerqueira, D. M., Pereira, M. S. F., Castanheira, F. V. S., Fernandes, T. D., Manin, G. Z., et al. (2017). Inhibition of caspase-1 or gasdermin-D enable caspase-8 activation in the Naip 5/NLRC4/ASC inflammasome. *PLoS Pathog.* 13:e1006502. doi: 10.1371/journal.ppat.1006502
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 489–517. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010
- Pandian, N., and Kanneganti, T. D. (2022). PANoptosis: a unique innate immune inflammatory cell death modality. *J. Immunol.* 209, 1625–1633. doi: 10.4049/jimmunol.2200508
- Sagulenko, V., Thygesen, S. J., Sester, D. P., Idris, A., Cridland, J. A., Vajjhala, P. R., et al. (2013). AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ.* 20, 1149–1160. doi: 10.1038/cdd.2013.37
- Sarhan, J., Liu, B. C., Muendlein, H. I., Li, P., Nilson, R., Tang, A. Y., et al. (2018). Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during Yersinia infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E10888–E10897. doi: 10.1073/pnas.1809548115
- Schwarzer, R., Laurien, L., and Pasparakis, M. (2020). New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8. *Curr. Opin. Cell Biol.* 63, 186–193. doi: 10.1016/j.cob.2020.02.004
- Shenderov, K., Riteau, N., Yip, R., Mayer-Barber, K. D., Oland, S., Hieny, S., et al. (2014). Cutting edge: endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1 β in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. *J. Immunol.* 192, 2029–2033. doi: 10.4049/jimmunol.1302549
- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320–7326. doi: 10.1074/jbc.M008363200
- Speir, M., Lawlor, K. E., Glaser, S. P., Abraham, G., Chow, S., Vogrin, A., et al. (2016). Eliminating legionella by inhibiting BCL-XL to induce macrophage apoptosis. *Nat. Microbiol.* 1:15034. doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.34
- Tummers, B., and Green, D. R. (2017). Caspase-8: regulating life and death. *Immunol. Rev.* 277, 76–89. doi: 10.1111/imr.12541
- Velasquez, L. N., Delpino, M. V., Ibanez, A. E., Coria, L. M., Miraglia, M. C., Scian, R., et al. (2012). *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. *Microbes Infect.* 14, 639–650. doi: 10.1016/j.micinf.2012.02.004
- Wang, L., Yan, H., Chen, X., Lee, J., Sun, J., Liu, G., et al. (2022). Caspase-8 is involved in pyroptosis, necroptosis and the maturation and release of IL-1 β in aspergillus fumigatus keratitis. *Int. Immunopharmacol.* 113:109275. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109275

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., et al. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cells* 153, 910–918. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025

Weng, D., Marty-Roix, R., Ganesan, S., Proulx, M. K., Vladimer, G. I., Kaiser, W. J., et al. (2014). Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune

responses and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 7391–7396. doi: 10.1073/pnas.1403477111

Zhang, L., Yu, S., Ning, X., Fang, H., Li, J., Zhi, F., et al. (2022). A Lys R transcriptional regulator manipulates macrophage autophagy flux during *Brucella* infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:858173. doi: 10.3389/fcimb.2022.858173