

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

MARCELLA RUNGUE OLIVEIRA

**O PAPEL DO RECEPTOR NLRP6 NA MANUTENÇÃO DA
HOMEOSTASE INTESTINAL FRENTE À INFECÇÃO POR
VIA ORAL PELA *Brucella abortus*.**

Belo Horizonte - MG

2018

MARCELLA RUNGUE OLIVEIRA

**O PAPEL DO RECEPTOR NLRP6 NA MANUTENÇÃO DA
HOMEOSTASE INTESTINAL FRENTE À INFECÇÃO POR
VIA ORAL PELA *Brucella abortus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadores:

Prof. Dra. Angélica Thomáz Vieira

(Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

(Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Belo Horizonte – MG

2018



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



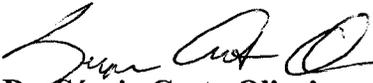
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARCELLA RUNGUE OLIVEIRA. Aos dezesseis dias do mês de julho de 2018 às 09:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado **“O PAPEL DO RECEPTOR NLRP6 NA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE INTESTINAL FRENTE À INFECÇÃO POR VIA ORAL PELA *Brucella abortus*.”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Angélica Thomaz Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Gustavo Batista de Menezes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

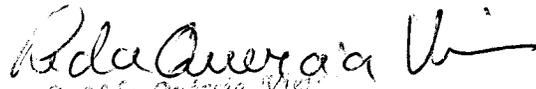
APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de julho de 2018.


 Dr. Gustavo Batista de Menezes (UFMG)


 Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)


 Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)


 Prof. Leda Quêrcia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós-graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Agradeço,

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, em especial,

Ao professor Sergio Costa Oliveira, pelo acolhimento em seu laboratório desde 2013 e por toda orientação, confiança e autonomia dadas a mim;

A professora Angélica Thomaz Vieira, pela orientação, dedicação, energia, e incansáveis discussões. Além, claro, da sua amizade, parceria, conselhos e comidinhas gostosas;

Aos professores Flaviano dos Santos Martins, Geovanni Dantas Cassali, Ana Lúcia Godard e sua aluna Ágatha Pedersen, e Leda Quércia Vieira, que contribuíram para realização deste trabalho;

Aos amigos e parceiros de experimentos David, Gabi, Victor, Ray, Pri e Vivi, por toda ajuda, carinho e inúmeras gargalhadas;

A Sandra, por toda sua dedicação, profissionalismo, amizade e acolhimento. Aos amigos do LIDI pela agradável convivência e companheirismo, e aos Bioteristas, por todo cuidado e respeito aos animais;

A minha família e namorado pela paciência, força e refúgio;

As agências financiadoras, Departamento de Bioquímica e Imunologia e a UFMG,

Muito obrigada!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

RESUMO

Brucella abortus é uma bactéria gram-negativa, intracelular facultativa e causadora da Brucelose que é adquirida através da ingestão de carne, leite e seus derivados contaminados. Além disso, é uma zoonose bacteriana das mais difundidas no mundo, levando ao aborto em animais domésticos e de criação. Estudos recentes sugerem que o NLRP6, membro da família de receptores do tipo NOD, tem importante papel na regulação da resposta imune, renovação das células epiteliais e na composição da microbiota intestinal. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos no processo de invasão e estabelecimento da infecção *Brucella abortus* por via oral, explorando o papel da molécula NLRP6 no processo de homeostase intestinal frente à infecção. Para isso, animais selvagens (WT) e deficientes para NLRP6 (Nlrp6^{-/-}) foram inoculados via intragástrica com *B. abortus* cepa virulenta S2308 e amostras de diferentes tecidos foram coletadas em diferentes tempos. Como resultados, foi observado que animais Nlrp6^{-/-} foram mais resistentes à infecção oral, apresentando redução da carga bacteriana no fígado, em relação aos WT. Entretanto, esse fenótipo não foi observado quando a infecção se deu por via intraperitoneal, sugerindo que o NLRP6 seja importante na fase de invasão de *B. abortus* através da mucosa intestinal. Além disso, a infecção oral induziu um aumento da permeabilidade intestinal nos animais WT infectados, mas não nos Nlrp6^{-/-}. Foi observado, também, alterações significativas na composição da microbiota intestinal durante a infecção em ambos os grupos de animais, sugerindo-se um quadro de disbiose, e, portanto, participação da microbiota intestinal no contexto do processo infeccioso por *B. abortus*. Ademais, o transplante fecal da microbiota proveniente dos WT e Nlrp6^{-/-} infectados para animais *germ-free* resultou no fenótipo de permeabilidade similar ao dos grupos doadores. No entanto, a depleção da microbiota por antibióticos de amplo-espectro nos animais WT preveniu a quebra de barreira epitelial intestinal e reduziu a carga bacteriana sistêmica. Por outro lado, a depleção em Nlrp6^{-/-} favoreceu a invasão da *B. abortus*, mesmo sem alteração da permeabilidade intestinal. Em resumo, esses resultados indicam que a infecção oral por *B. abortus* altera a homeostase intestinal em favorcimento a sua invasão e estabelecimento de infecção sistêmica, e um dos mecanismos envolvidos nesse processo é dependente da molécula NLRP6. O NLRP6 mostrou-se importante no controle da sobrevivência da bactéria *B. abortus*, na manutenção da barreira epitelial e na regulação negativa da resposta imune frente a infecção por via oral pela *Brucella abortus*, na qual a microbiota intestinal parece exercer um papel determinante.

ABSTRACT

Brucella abortus is a gram-negative, facultative intracellular bacterium that causes Brucellosis acquired through ingestion of meat, milk and its contaminated derivatives. In addition, it one of the most widespread bacterial zoonosis, leading to abortion in domestic and farmed animals. Recent studies suggest that the NLRP6, a member of NOD-like receptor family, plays an important role in the regulation of immune response, epithelial cell turnover and in the composition of the gut microbiota. In this context, the objective of this work was to study the mechanisms involved in the invasion and establishment of oral *Brucella abortus* infection, exploring the role of NLRP6 in the intestinal homeostasis during infection. Wild-type (WT) and NLRP6 (Nlrp6^{-/-}) deficient animals were inoculated intragastrically with *B. abortus* virulent strain S2308 and samples from different tissues were collected at different times. As results, it was observed that Nlrp6^{-/-} mice were more resistant to oral infection, presenting reduction of bacterial load in the liver when compared to WT animals. However, this phenotype was not observed when the infection occurred intraperitoneally, suggesting that NLRP6 is important in the phase of *B. abortus* invasion through the intestinal mucosa. In addition, oral infection induced an increase in intestinal permeability in infected WT mice, but not in Nlrp6^{-/-}. Significant changes in the composition of the intestinal microbiota during infection in both groups of animals were also observed, suggesting dysbiosis. Therefore, our findings suggest the participation of the gut microbiota in the context of *B. abortus* infection. Additionally, fecal transplantation of the microbiota from the infected WT and Nlrp6^{-/-} to germ-free mice resulted in similar donor permeability phenotype. However, depletion of the microbiota by broad-spectrum antibiotics in WT animals prevent leaky gut and reduced systemic bacterial load. On the other hand, depletion of the microbiota in Nlrp6^{-/-} favored the invasion of *B. abortus*, even without intestinal permeability change. In summary, these results indicate that oral infection by *Brucella abortus* alters intestinal homeostasis in favor of its invasion and establishment of systemic infection in a mechanism dependent of NLRP6. NLRP6 is important in the control of bacteria survival, in the maintenance of the intestinal epithelial barrier and in the negative regulation of the immune response against oral infection caused by *Brucella abortus*, in which the gut microbiota seems to play a critical role.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS E QUADROS	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O gênero <i>Brucella</i> e a Brucelose: um breve histórico	16
1.2. Patogênese	20
1.3. Resposta Imune à <i>Brucella</i>	22
1.4. Barreira Epitelial Intestinal	23
1.5. Microbiota <i>versus</i> Hospedeiro	25
1.6. Inflamassoma no contexto intestinal.....	27
1.7. NLRP6	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Animais experimentais	34
4.2. Bactéria, condições de cultivo e infecção <i>in vivo</i> dos animais	34
4.3. Ensaio de permeabilidade intestinal <i>in vivo</i>	35
4.4. Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC)	35
4.5. Análise Histopatológica	36
4.6. PCR em tempo real	36
4.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	36
4.6.2. Desenho dos Primers	36
4.6.3. Reação de PCR em tempo Real.....	37
4.6.4. Normalização dos dados de PCR em tempo real.....	38
4.7. Infecção de células epiteliais intestinais murinas pelo patógeno <i>B. abortus</i>	38

4.7.1.	Isolamento das células do epitélio intestinal	38
4.7.2.	Citometria de Fluxo.....	39
4.8.	Análise do perfil da microbiota intestinal.....	40
4.9.	Transplante da microbiota intestinal para animais <i>germ-free</i> por convencionalização	40
4.10.	Depleção da microbiota intestinal por meio de coquetel de antibióticos.....	40
4.11.	Medida da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	41
4.12.	Medida da atividade da Peroxidase Eosinofílica (EPO).....	41
4.13.	Contagem total de leucócitos circulantes.....	42
4.14.	Dosagem de citocinas	42
4.15.	Dosagem de sIgA.....	43
4.16.	Contagem de UFC no lavado broncoalveolar (LBA)	43
4.17.	Análise estatística	44
5.	RESULTADOS	45
5.1.	Caracterização da cinética de infecção por via oral por <i>Brucella abortus</i> em camundongos C57BL/6.....	45
5.2.	Caracterização do dano tecidual no intestino de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela <i>Brucella</i>	46
5.3.	Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i> à infecção por via oral por <i>Brucella abortus</i> em camundongos WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-}	48
5.4.	Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção por via oral por <i>B. abortus</i>	50
5.5.	Avaliação da expressão dos transcritos de MUC1, MUC2, Anfirregulina e IL-18 após infecção por via oral por <i>B. abortus</i>	51
5.6.	Avaliação <i>ex vivo</i> do potencial de infecção de <i>B. abortus</i> em células epiteliais intestinais murinas	53
5.7.	Avaliação do perfil da microbiota intestinal em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção por via oral por <i>B. abortus</i>	56

5.8. Avaliação da permeabilidade intestinal de camundongos <i>germ-free</i> receptores da microbiota de animais WT e Nlrp6 ^{-/-} infectados por <i>B. abortus</i>	59
5.9. Avaliação do papel da microbiota intestinal sobre os fenótipos de permeabilidade e susceptibilidade <i>in vivo</i> após infecção por <i>B. abortus</i> em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-}	60
5.10. Avaliação do perfil celular intestinal e sistêmico após infecção por <i>B. abortus</i> em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-}	63
5.11. Avaliação da produção de citocinas no tecido intestinal de animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção por <i>B. abortus</i>	65
5.12. Dosagem de Imunoglobulina (Ig) A secretada, após infecção por <i>B. abortus</i> , em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-}	67
5.13. Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i> frente à infecção pulmonar por <i>B. abortus</i> em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-}	69
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÃO.....	80
8. MODELO.....	810
9. REFERÊNCIAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- β -act** – Beta-actina
- μ g** – Micrograma
- μ L** – Microlitro
- AIM2** – *Absent in melanoma 2*
- AMPs** – Peptídeos antimicrobianos
- APC** – Célula Apresentadora de Antígeno
- ASC** – *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
- BB** – *Brucella broth*
- BCV** – Vacúolos contendo *Brucella*
- BSA** – Albumina do soro bovino
- CARD** – Domínio C-terminal recrutador e ativador de caspases
- CDC** – *Centers for Disease Control and Prevention*
- cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar
- Ct** – Threshold cycle
- DC** – Células dendríticas
- EDTA** – *EthyleneDiamineTetracetic acid*
- ELISA** – Ensaio de absorção imunoenzimático
- EPO** – Peroxidase Eosinofílica
- Gapdh** – *Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase*
- GFP** – *Green fluorescent protein*
- GPCRs** – Receptores acoplados a proteína G
- H&E** – Hematoxilina e Eosina
- HTAB** – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- HTAB** – Hexadecyl trimethyl ammonium bromide
- IECs** – Células epiteliais intestinais
- IFN** – Interferon
- IL** – Interleucina
- KO** – *Knockout*
- LAMP-1** – *Lysosomal-associated membrane protein 1*
- LBA** – Lavado broncoalveolar
- LPS** – Lipopolissacarídeo

LRR – *Leucine-rich repeat containing domain* (domínio rico em leucinas)
MAMPs – Padrões moleculares associados a microrganismos
MPO – Mieloperoxidase
MUC – Mucina
MyD88 – Fator de Diferenciação Mielóide 88
NF- κ B – Fator nuclear kappaB
NK – *Natural killer* (assassinas naturais)
NLR – *NOD like receptors*
NLRP6 – *NLR family pyrin domain containing 6*
NOD – *Nucleotide-binding oligomerization domain*
NTC – *Non-template control*
OD – Densidade óptica
OPD – *o*-fenilenodiamina
PAMP – Padrão molecular associado à patógeno
PBS – Tampão salina fosfato
PCR – Reação em cadeia da Polimerase
PGN – Peptidoglicanos
PRRs – Receptores de reconhecimento padrão
PYPAF5 – *PYRIN-containing apoptotic protease-activating factor-5-like protein*
RE – Retículo endoplasmático
RNA – Ácido ribonucleico
Rpm – Rotações por minuto
SFB – Soro fetal bovino
sIgA – Imunoglobulina A secretada
SST4 – Sistema de secreção do tipo IV
STING – *Stimulator of interferon genes*
TGI – Trato gastrointestinal
TLR – Receptores do tipo Toll
TLR – Receptores do tipo Toll
TMB – Tetramethylbenzidine
UFC – Unidades formadoras de colônia
WT – *Wild-Type* (tipo selvagem)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – David Bruce e o laboratório (restaurado), em Malta, no qual desenvolvia suas pesquisas.....	16
Figura 2 – <i>Brucella abortus</i>	17
Figura 3 – Estrutura da barreira epitelial intestinal.....	25
Figura 4 – Interações entre a microbiota intestinal e o sistema imune do hospedeiro.....	27
Figura 5 – Estrutura esquemática de importantes receptores formadores de inflamassomas intestinais.....	30
Figura 6 – Inflamassoma Nlrp6 nas células epiteliais do intestino.....	31
Figura 7 – Cinética da permeabilidade intestinal de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela <i>B. abortus</i>	45
Figura 8 – Cinética da carga bacteriana no fígado e baço de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela <i>B. abortus</i>	46
Figura 9 – Dano tecidual no intestino de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela <i>B. abortus</i>	47
Figura 10 – Cinética da carga bacteriana no fígado de camundongos WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção por via oral pela <i>B. abortus</i>	48
Figura 11 – Contagem de UFC no fígado de camundongos WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção por via intraperitoneal por <i>B. abortus</i>	49
Figura 12 – Permeabilidade intestinal de camundongos WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção oral por <i>B. abortus</i>	50

Figura 13 – Expressão de transcritos das moléculas MUC1, MUC2, Anfirregulina e IL-18 em intestino delgado de camundongos WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção oral por <i>B. abortus</i>	52
Figura 14 – Contagem de UFC no fígado de camundongos WT <i>versus</i> IL-18 ^{-/-} após infecção oral por <i>B. abortus</i>	53
Figura 15 – Infecção de <i>B. abortus</i> em células epiteliais intestinais murinas.....	54
Figura 16 – Perfil quantitativo da microbiota intestinal cultivável de animais WT e Nlrp6 ^{-/-} após infecção oral por <i>B. abortus</i>	57
Figura 17 – Perfil qualitativo da microbiota intestinal cultivável de animais WT e Nlrp6 ^{-/-} após infecção oral por <i>B. abortus</i>	58
Figura 18 – Representação esquemática do procedimento de transplante da microbiota intestinal de animais convencionais para animais <i>germ-free</i>	59
Figura 19 – Permeabilidade intestinal de camundongos <i>germ-free</i> transplantados com a microbiota de animais WT e Nlrp6 ^{-/-} infectados por <i>B. abortus</i>	60
Figura 20 – Permeabilidade intestinal e Carga bacteriana hepática em camundongos WT e Nlrp6 ^{-/-} , com a microbiota depletada, infectados por <i>B. abortus</i>	61
Figura 21 – Perfil celular intestinal e sistêmico após infecção por <i>B. abortus</i> em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-}	64
Figura 22 – Produção de citocinas e quimiocinas no tecido intestinal de animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção oral por <i>B. abortus</i>	66
Figura 23 – Dosagem de sIgA em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção oral por <i>B. abortus</i>	67

Figura 24 – Dosagem de sIgA em animais <i>germ-free</i> receptores da microbiota de camundongos WT e Nlrp6 ^{-/-}	68
Figura 25 – Carga bacteriana no lavado broncoalveolar de animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-} após infecção pulmonar por <i>B. abortus</i>	69
Figura 26 – Modelo da resposta à infecção oral por <i>B. abortus</i> em animais WT <i>versus</i> Nlrp6 ^{-/-}	79

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – As diferentes espécies do gênero <i>Brucella</i> e seus reservatórios conhecidos.....	19
Quadro 1 – Tempo de sobrevivência de <i>Brucella sp.</i> (A) e <i>Brucella abortus</i> (B), segundo o ambiente e o tempo.....	20
Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados na realização da curva de diluição e na quantificação relativa por PCR em tempo real.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Brucella* e a Brucelose: um breve histórico

Doença de Bang, aborto contagioso ou infeccioso, febre ondulante, doença das mil faces, febre de Malta, febre de Gibraltar, febre intermitente do Mediterrâneo, febre de Bang, febre napolitana ou melitococia são as diversas denominações alusivas à Brucelose no decorrer da história. Em 1887, o patologista e microbiologista Escocês David Bruce isolou um dos agentes etiológicos dessa doença do fígado de soldados doentes na ilha de Malta, que foi denominado à época de *Micrococcus melitensis* (Bruce, 1887; Lawinsky, Ohara *et al.*, 2010). Dezoito anos depois, em 1905, Zammit, um médico Maltês, demonstrou a natureza zoonótica dessa bactéria após isolá-la em leite de cabra (Wyatt, 2005). Ademais, em 1917, os veterinários dinamarqueses Benhard Bang e Stribol, isolaram uma bactéria de feto bovino abortado a qual denominaram *Bacillus abortus*. No ano seguinte, a pesquisadora americana Alice Evans publicou um importante trabalho no qual demonstrou as semelhanças morfológicas, imunológicas e de cultivo entre *Micrococcus melitensis* e *Bacillus abortus* o que levou a decisão de criar um novo gênero, denominado *Brucella*, em homenagem ao seu descobridor David Bruce (**Figura 1**) (Nicoletti, 2002; Poester, 2009).



Figura 1 – David Bruce e o laboratório (restaurado), em Malta, no qual desenvolvia suas pesquisas. (Google imagens; Nicoletti, 2002)

Atualmente, o gênero *Brucella* está incluído na subclasse α -2 da classe Proteobactéria, próximo à bactérias patogênicas simbióticas de vegetais, tais como *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium meliloti*; bactérias fotossintéticas, como *Rhodobacter sphaeroides*; e patógenos intracelulares obrigatórios, como os representantes do gênero *Rickettsia* (Ugalde, 1999).

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são caracterizadas como cocobacilos (**Figura 2**) gram-negativos, imóveis, que não esporulam e não encapsulam. Medem cerca de 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm de dimensão (Walker, 2003). São parasitas intracelulares facultativos e possuem membrana celular externa composta principalmente de lipopolissacarídeo (LPS), considerado um dos principais fatores de virulência desse gênero (Corbel e Morgan, 1984; Martin e Hancock, 1990).

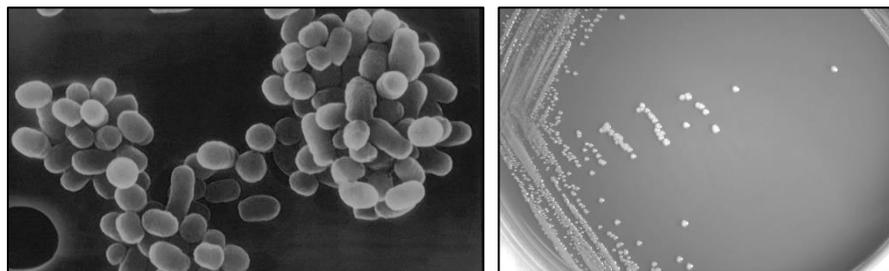


Figura 2 – *Brucella abortus*. Micrografia eletrônica de varredura (à esquerda) e cultivo em meio sólido (à direita) (CPimages.ca/Phototake; Dennis Kunkel Microscopy/Science Photo Library)

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias desse gênero, acometendo o homem e uma grande variedade de animais de criação e domésticos (Nicoletti, 1989). As bactérias do gênero *Brucella* exibem características antigênicas, metabólicas e de preferência ao hospedeiro distintas (**Tabela 1**) diferindo, também, quanto a gravidade da doença causada (Walker, 2003). É prevalente em diversos países, sendo que a região do Mediterrâneo, o Oriente Médio, Arábia Saudita, México, América Central e do Sul, Ásia Central e Índia são as regiões mais afetadas pela brucelose (Pappas, Papadimitriou *et al.*, 2006).

As três espécies que apresentam maior risco de infecção para humanos são: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis*. Apesar de *B. melitensis* ser a mais patogênica, *B. abortus* é a principal fonte de infecção, por ser a espécie mais difundida no mundo (Corbel, 1997).

Tabela 1 – As diferentes espécies do gênero *Brucella* e seus reservatórios conhecidos (Adaptado de Paraná, 2015).

Espécie	Reservatórios
<i>Brucella abortus</i>	Bovinos, equinos e bubalinos
<i>Brucella melitensis</i>	Caprinos, ovinos e camelídeos
<i>Brucella suis</i>	Suínos e vários mamíferos selvagens
<i>Brucella canis</i>	Caninos
<i>Brucella ovis</i>	Ovinos
<i>Brucella neotomae</i>	Ratos de florestas e do deserto
<i>Brucella microti</i>	Roedores, solo
<i>Brucella inopinata</i>	Humanos*
<i>Brucella pinnipedialis</i>	Penípedes
<i>Brucella ceti</i>	Cetáceos

*Isolado de humanos, mas sem reservatório animal encontrado (Scholz, Nockler *et al.*, 2010).

A infecção natural por *Brucella* ocorre principalmente pelas vias oral e nasal através de: consumo de leite cru e produtos lácteos sem pasteurização provenientes de animais infectados — nesse caso a *B. abortus* pode sobreviver de duas semanas até seis meses (**Quadro 1**) —, ingestão de carne (menos comum em países onde a ingestão de carne crua não é habitual), inalação de aerossóis contendo o patógeno, contato com animais infectados e suas secreções (principalmente com material de aborto), e pelo hábito dos bovinos de lamber e cheirar animais recém-nascidos ou mesmo fetos abortados. Além disso há, também, contaminação laboratorial e ocupacional, acometendo pesquisadores, agropecuaristas, trabalhadores de matadouros, açougueiros e médicos veterinários (muitos casos de auto inoculação acidental da vacina contra brucelose animal) além de existirem formas — apesar de muito improváveis — de transmissão humana como a contaminação de vegetais por fezes e urina de animais infectados e por aleitamento materno (Silva, Paixao *et al.*, 2005; Seleem, Boyle *et al.*, 2010; Paraná, 2015).

Quadro 1 – Tempo de sobrevivência de *Brucella* sp. (A) e *Brucella abortus* (B), segundo o ambiente e o tempo.
(Paraná, 2015)

A Tempo de sobrevivência da <i>Brucella</i> sp		B Sobrevivência da <i>Brucella abortus</i>	
Meio	Tempo	Meio	Tempo
Leite	17 dias	Luz direta	4,5 horas
Leite congelado	> 800 dias	Solo seco	4 dias
Queijos	até 6 meses	Solo úmido	66 dias
Manteiga	até 4 meses	Solo frio	151-185 dias
logurte 43 a 46 °C / pH 3,9	2,5 a 3,5 horas	Fezes fluidas	8-240 dias
logurte -18 a 34 °C / pH 3,7	89 a 96 dias	Fezes (altas temperaturas)	2 dias
Cocção a 60 °C	10 minutos	Urina	5 dias
Cocção a 71,7 °C	15 segundos	Água tratada	5-114 dias
Água e solo úmido	10 semanas	Água poluída	30-150 dias
		Feto à sombra	180 dias

No Brasil, a brucelose bovina ocorre em todo o território nacional. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o número de casos de brucelose bovina no Brasil cresceu de aproximadamente 13.000 casos, em 2000, para 80.000 casos em 2004. Além da possível contaminação dos consumidores de produtos de origem animal, a brucelose leva ao aborto ou esterilidade permanente em uma a cada cinco vacas infectadas por *B. abortus*, o que provoca uma redução de 15% na produção de bezerros. Além disso, estima-se que a brucelose seja responsável pela diminuição de 25% na produção de leite e carne, tornando-os vulneráveis a barreiras sanitárias no mercado internacional e causando um prejuízo de 32 milhões de dólares ao ano para a economia brasileira (Poester *et al.*, 2002; Agricultura, 2006).

A incidência da doença em humanos varia consoante a densidade do rebanho caprino e ovino, o grau de endemia animal, o nível socioeconômico e os hábitos alimentares. Acredita-se que sua incidência seja cinco vezes superior aos números oficiais, sobretudo devido ao não diagnóstico e ao não cumprimento da notificação obrigatória (Pessegueiro, Barata *et al.*, 2003).

Com a dificuldade de detecção, fácil disseminação e patogênese prolongada, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) classificou o gênero *Brucella* como categoria B, o que significa se tratar de organismos com risco de uso como arma biológica e bioterrorismo (Pappas, Papadimitriou *et al.*, 2006).

1.2. Patogênese

A brucelose é uma doença sistêmica na qual qualquer órgão ou tecido do organismo pode estar envolvido. Os indivíduos acometidos apresentam sintomas inespecíficos compartilhados com diversas outras doenças, isso faz com que a brucelose humana apresente dados subestimados de distribuição epidemiológica (Who, 2006). Em humanos os principais sintomas da fase aguda da doença são febre ondulante, dores de cabeça, fadiga, mialgia e perda de peso. Na fase crônica da doença pode ser observada endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas (Solera, 2010).

Nos animais a brucelose é uma infecção crônica que persiste por toda a vida. Nas fêmeas, *Brucella* possui tropismo pelo hormônio placentário bovino, o eritritol, levando a lesões nas glândulas uterinas enquanto que, nos machos, a bactéria possui tropismo por hormônios masculinos, como a testosterona, dirigindo-se aos testículos. Assim, a infecção por *Brucella* afeta principalmente os órgãos reprodutivos causando aborto e infertilidade (Young, 1988).

A habilidade de *Brucella* causar doença requer alguns passos críticos durante a infecção. A patogênese causada pela infecção por *Brucella* está associada à sua capacidade de evitar mecanismos de defesa do hospedeiro, resultando na sua proliferação intracelular (Sangari e Agüero, 1996).

Vários mecanismos de virulência já foram verificados no gênero *Brucella*, dentre eles: o sistema de secreção do tipo IV (SST4) — importante para sobrevivência e replicação intracelular da *Brucella* (Hong, Tsolis et al., 2000) —; o sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS — essencial para que a bactéria mude do meio extracelular para o ambiente intracelular (Guzman-Verri, Manterola et al., 2002) —; o sistema transportador do tipo ABC — constituído por proteínas que fazem o transporte transmembrana de peptídeos, poliaminas, íons, aminoácidos, ferro e sulfatos para o interior da bactéria e exportam antibióticos, ácidos graxos e toxinas da mesma (Tam e Saier Jr, 1993) —; o LPS (lipopolissacarídeo) — que possui baixa toxicidade para os macrófagos, baixa pirogenicidade e baixa atividade ferropênica —; os β -1,2 glucanos cíclicos — diretamente relacionado ao tráfego intracelular; atividade de catalase e urease —; além de determinados genes (*pgm*, *rfbE*, *pmm* e *whoA*, relacionados a síntese de LPS; *cydB*, atividade citocromo oxidase; *ahpC* e *ahpD*, proteínas contra danos dos radicais de oxigênio; *purE*, síntese de purinas) entre outros (Ko e Splitter, 2003; Seleem, Boyle et al., 2010).

Assim como a grande maioria das bactérias intracelulares patogênicas, *Brucella* é capaz de atravessar a barreira epitelial permitindo infecção através de superfícies mucosas. Entretanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo de invasão. Geralmente através do aparelho digestivo ou trato respiratório, essas bactérias são capazes de invadir e sobreviver dentro de células fagocíticas (macrófagos, monócitos e células dendríticas) ou não fagocíticas (como fibroblastos, trofoblastos, entre outras) hospedeiras (Carvalho Neta, Mol *et al.*, 2010).

Após a internalização ocorre a formação de vacúolos contendo *Brucella*, denominados BCVs (*Brucella containing vacuole*). Tal vacúolo entra em processo de maturação, no qual sofre acidificação (Porte, Liautard *et al.*, 1999), o que constitui um sinal para a indução da expressão dos genes *virB* da bactéria (Boschioli, Ouahrani-Bettache *et al.*, 2002). Esses genes codificam o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) que tem sido apontado como um fator de virulência essencial para a resistência e replicação das bactérias do gênero *Brucella* (Celli, 2006). O T4SS *virB* contribui para a sobrevivência do patógeno alterando o tráfego intracelular e possibilitando a formação do nicho replicativo (De Jong, Sun *et al.*, 2008). Apenas 15 a 30% das bactérias internalizadas conseguem evitar a fusão com lisossomos e redirecionar sua trajetória para atingir o estágio replicativo (Gorvel e Moreno, 2002).

Após sofrer a acidificação, o BCV interage com a via endocítica e adquire uma glicoproteína de membrana, LAMP-1, marcadora de endossomos tardios tornando-se um vacúolo intermediário (Celli, De Chastellier *et al.*, 2003; Starr, Ng *et al.*, 2008). Entretanto, mais tardiamente a bactéria consegue promover a perda deste marcador evitando assim a fusão do vacúolo com o lisossomo. A partir deste momento, o BCV mantém contato com o retículo endoplasmático (RE) de maneira dependente de T4SS *virB* e adquire marcadores específicos do RE em sua superfície, formando finalmente a organela replicativa da *Brucella* (Celli, De Chastellier *et al.*, 2003).

Outra maneira que as bactérias do gênero *Brucella* possuem para evadir o sistema de defesa do hospedeiro é através da produção de moléculas modificadas que são fracamente reconhecidas pelos receptores do hospedeiro (De Jong, Sun *et al.*, 2008). O seu LPS não convencional, por exemplo, possui no lipídeo A (uma das três partes que compõem o LPS) resíduos de ácidos graxos muito mais longos do que o LPS de enterobactérias. Essa modificação torna o LPS da *Brucella* fracamente reconhecido pelos receptores de superfície celular da imunidade inata (Lapaque, Moriyon *et al.*, 2005) e, também, o transforma em um alvo fraco de

ligação para o componente C3 do sistema do complemento (Barquero-Calvo, Chaves-Olarte *et al.*, 2007).

Os mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro tornam-se a principal base para o estabelecimento da infecção crônica. E, como resposta do organismo à persistência da bactéria no tecido, ocorre a formação de granulomas, que podem ser encontrados no fígado e também em outros órgãos com intuito de restringir o crescimento bacteriano (Hunt e Bothwell, 1967; Grilló, Blasco *et al.*, 2012).

1.3. Resposta Imune à *Brucella*

O sistema imune tem sido didaticamente dividido em inato e adaptativo que atuam de forma integrada para induzir uma resposta eficaz do hospedeiro. O sistema imune adaptativo é mais lento para desenvolver resposta contra os agentes patogênicos (quando comparado com o inato) e responde a antígenos específicos gerando memória imunológica. Pelo contrário, a resposta imune inata é rápida e funciona como a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos (Gomes, Campos *et al.*, 2012). É caracterizada por ser uma resposta imune não específica, que ocorre nos estágios iniciais da infecção, agindo na redução do número inicial do patógeno, sem memorização, contudo, também sendo essencial para o desencadeamento da resposta imune adaptativa (Ko e Splitter, 2003). É constituída pelas barreiras físicas da superfície do corpo, fatores solúveis tais como proteínas do complemento e, também, por diversas células, incluindo macrófagos, células dendríticas (DC), granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos) e células NK (Dranoff, 2004).

Os agentes patogênicos exibem regularmente uma assinatura molecular conhecida como padrões moleculares associados a patógenos, os PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Os mais comuns são: lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicanos (PGN), lipoproteínas bacterianas, flagelina, e ácidos nucleicos derivados de vírus, bactérias, fungos e protozoários (Gomes, Campos *et al.*, 2012). O reconhecimento pelo hospedeiro ocorre mediante a interação dos PRRs com os PAMPs. Os PRRs (*pattern recognition receptors*) são os receptores responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs. A ligação destes PAMPs a seus receptores dispara sinais que ativam as APCs (células apresentadoras de antígenos) tais como macrófagos e células dendríticas e facilitam a fagocitose dos microrganismos (Akira, Uematsu *et al.*, 2006).

Várias famílias de receptores têm sido identificadas como responsáveis pelo reconhecimento, tais como a família dos receptores NOD (NOD like receptors - NLR) (Inohara

e Nunez, 2003) e a família dos receptores do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLR) (Medzhitov, Preston-Hurlburt *et al.*, 1997). Um dos primeiros estudos evidenciando o envolvimento de TLRs na resistência a *B. abortus* foi feito utilizando-se camundongos deficientes para a molécula adaptadora MyD88 e evidenciou grande importância dessa molécula (Macedo *et al.*, 2008). O reconhecimento de moléculas associadas à *B. abortus* por TLR2 (proteínas da membrana externa, Omp16 e Omp19), TLR4 (LPS da *Brucella* e a *Brucella* lumazine sintase) e TLR9 (DNA da *Brucella*), ativa a sinalização intracelular via MyD88 resultando na ativação de NF- κ B, MAP cinases e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Campos, Rosinha *et al.*, 2004; Huang, Ishii *et al.*, 2005; Weiss, Takeda *et al.*, 2005; Macedo, Magnani *et al.*, 2008; Oliveira, De Oliveira *et al.*, 2008). Um papel proeminente foi conferido ao TLR9 em relação ao controle *in vivo* e *in vitro* da infecção por *B. abortus* (Gomes, Campos *et al.*, 2016).

Além dos receptores mencionados acima, *B. abortus* leva a ativação dos inflamassomas NLRP3 (através de espécies reativas de oxigênio mitocondrial induzidas pela bactéria) e AIM2 (reconhecimento do DNA bacteriano) levando ao controle da infecção (Gomes, Campos *et al.*, 2013). A proteína STING também foi identificada como um adaptador necessário para produção de IFN do tipo I em resposta a essa bactéria (Marim, Franco *et al.*, 2017).

Enquanto a importância funcional de diversos receptores da imunidade inata é bem estudada no contexto da infecção sistêmica por *B. abortus*, os mecanismos de entrada desse patógeno, particularmente através do trato gastrointestinal, são pouco conhecidos na literatura.

1.4. Barreira Epitelial Intestinal

O epitélio intestinal é a maior superfície de mucosa do corpo, cobrindo aproximadamente 400m² de área de superfície com uma única camada de células organizadas em criptas e vilosidades (**Figura 3**). As células do epitélio intestinal (IECs) desempenham funções essenciais tais como a secreção de componentes que influenciam na colonização microbiana, amostragem do microambiente intestinal, sensoriamento de micro-organismos benéficos ou nocivos e a indução e modulação da resposta imune. As IECs formam uma estrutura interconectada por junções estreitas que além de promover a comunicação célula-célula, estabelece uma barreira física e de permeabilidade controlada no ambiente intestinal.

Essas células são, principalmente, de cinco tipos: os enterócitos — possuem papel de absorção, secreção de citocinas e alta taxa de renovação —, as células caliciformes — responsáveis pela produção de mucinas que constituirão a camada de muco protetora

encontrada sobre a monocamada do epitélio intestinal —, as células de Paneth — produtoras de defensinas e peptídeos antimicrobianos —, as células M (*Microfold cells*) — responsáveis pela internalização e transporte de antígenos luminiais — e, por fim, as células neuroendócrinas que são responsáveis pela produção de hormônios e mediadores que regulam a função digestória propriamente dita (Duerr e Hornef, 2012; Peterson e Artis, 2014).

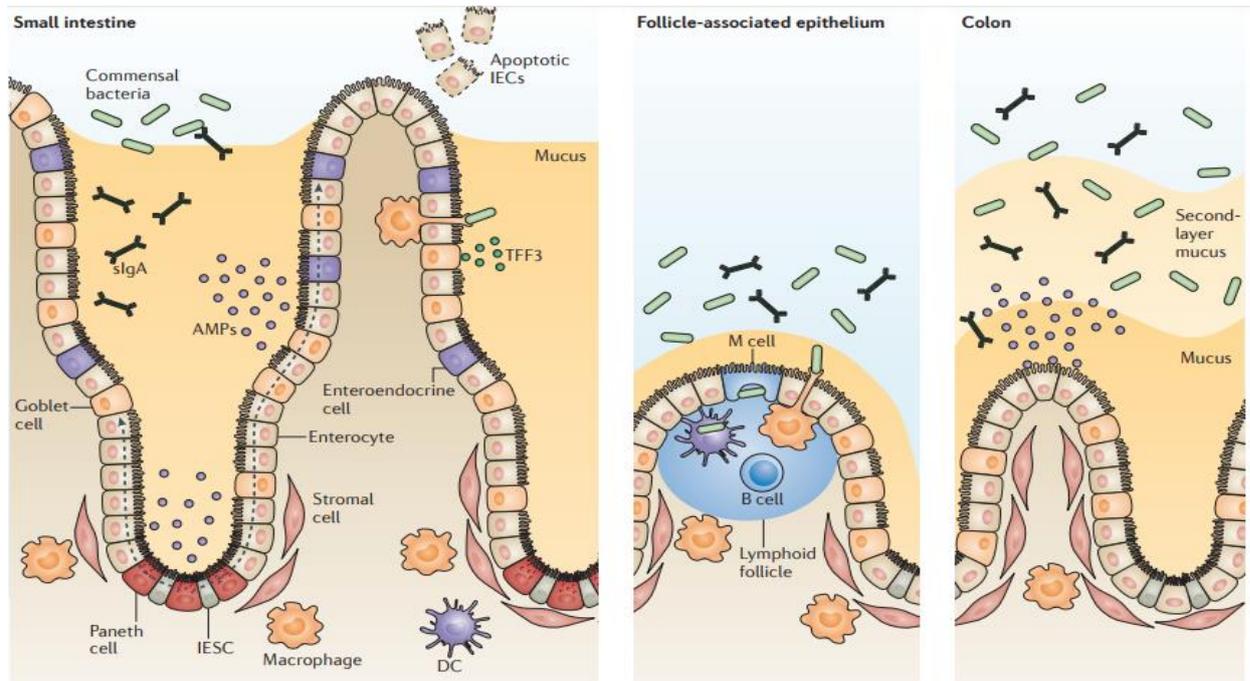


Figura 3 – Estrutura da barreira epitelial intestinal. As células do epitélio intestinal formam uma barreira física e bioquímica que mantém a segregação entre a comunidade microbiana presente no lúmen intestinal e o sistema imune de mucosa. Um nicho de células tronco epiteliais intestinais controla a renovação contínua da camada de células epiteliais por células tronco residentes da cripta. IECs diferenciadas, com exceção das células de Paneth, migram pelo o eixo cripta-vilosidade, como indicado pelas setas tracejadas. Células Caliciformes e de Paneth secretam muco e peptídeos antimicrobianos (AMPs) que promovem a restrição de bactérias à superfície epitelial. A transcitose e a liberação luminal de IgA secretada (sIgA) contribui, ainda mais, para função de barreira. Células M (*Microfold cells*) e Caliciformes medeiam o transporte de antígenos luminiais e bactérias vivas através da barreira epitelial para macrófagos residentes e células dendríticas (DC) que podem amostrar o lúmen através de dendritos transepiteliais (Peterson e Artis, 2014).

Todos os dias uma grande carga de antígenos é apresentada ao trato gastrointestinal, tanto na forma de bactérias comensais quanto de antígenos externos (da dieta ou mesmo do ambiente). O sistema imunológico deve ser capaz de discriminar os agentes patogênicos, que requerem uma resposta imune protetora, da microbiota bacteriana normal, para qual é necessário desenvolver e manter um estado de tolerância. A camada epitelial fornece o primeiro nível celular de proteção, formando não apenas uma barreira, mas também um sensor que fornece comunicação bidirecional com outras células linfoides residentes na mucosa. Além disso, linfócitos, células dendríticas, mastócitos e eosinófilos da lâmina própria formam uma

rede capaz de orquestrar resposta imune inata e adaptativa diante de possíveis agentes patogênicos (Wershil e Furuta, 2008).

Quanto ao processo de invasão da *Brucella* através das barreiras da mucosa, pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos ou mesmo da capacidade desse patógeno de interagir com as células epiteliais do trato gastrointestinal (TGI), com a microbiota do hospedeiro e, tampouco, a resposta imunológica e homeostática subsequentes no TGI do hospedeiro. As vias nasal e intraperitoneal são as mais comumente utilizadas nos estudos em modelo murino, a última objetivando favorecer a disseminação sistêmica imediata da *Brucella* e sua proliferação em tecidos linfoides, principalmente no baço. Porém, tendo em vista que a via oral é a principal rota de infecção natural no homem e nos animais, torna-se essencial seu melhor entendimento. Cabe salientar que a entrada da *Brucella* no trato gastrointestinal tem sido associada ao transporte pelas células M, atingindo facilmente os macrófagos e células dendríticas da lâmina própria (Ackermann, Chevillat *et al.*, 1988; Pappas, Papadimitriou *et al.*, 2006). Portanto, ainda há um universo de mecanismos a ser explorado no sentido de melhor compreender a rota natural dessa infecção.

1.5. Microbiota versus Hospedeiro

Cerca de 100 trilhões de bactérias coevoluem com seu hospedeiro formando a microbiota do trato gastrointestinal. A relação existente entre eles é extremamente importante uma vez que esses microrganismos desempenham funções fundamentais como digestão de alimentos, metabolismo de drogas, metabolização de compostos tóxicos e carcinogênicos, produção de vitaminas essenciais, prevenção da adesão de bactérias patogênicas e a modulação do sistema imune. Esse último se dá, por exemplo, através da produção de fatores benéficos como os ácidos graxos de cadeia curta, a partir da fermentação de fibras solúveis da dieta do hospedeiro pela microbiota simbiótica — tal quais as dos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides* (Hill e Artis, 2010).

Além disso, a microbiota desempenha papel fundamental na homeostase intestinal. Ela está constantemente sendo amostrada pelos tecidos linfoides associados à mucosa (Hu, Peng *et al.*) o que leva a promoção de um estado de inflamação fisiológica no intestino e geração de tolerância a estes microrganismos residentes (Cook e Sellin, 1998; Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010). Esse processo de homeostase intestinal também é resultante do reconhecimento dessa microbiota comensal —MAMPs (padrões moleculares associados a

microrganismos) — pelos receptores da imunidade inata e envolve uma variedade de PRRs como os receptores do tipo Toll (TLRs), tipo NOD (NLRs), acoplados a proteína G (GPCRs) e STING que são expressos constitutivamente nas células epiteliais, linfoides e mieloides (Rakoff-Nahoum, Paglino *et al.*, 2004; Artis, 2008; Barber, 2015) (**Figura 4**).

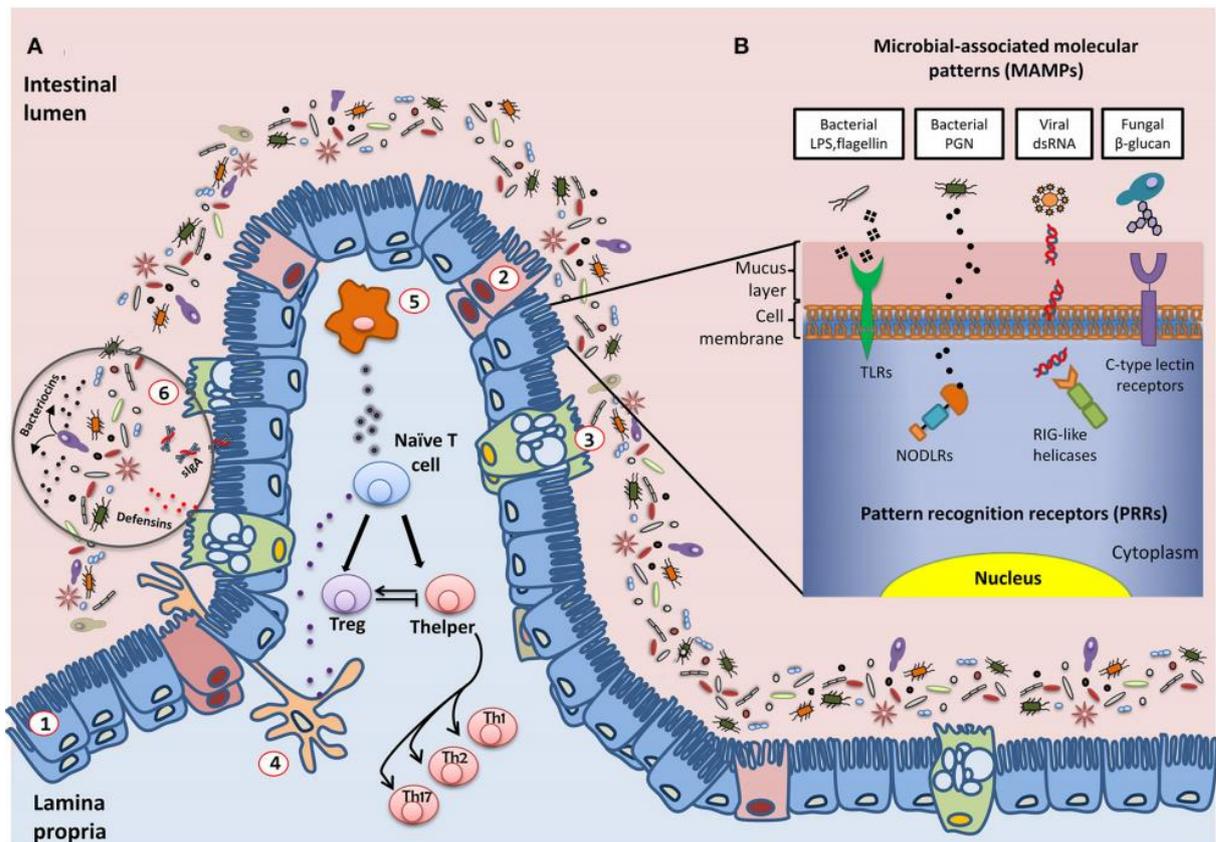


Figura 4 – Interações entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico do hospedeiro. (A) Panorama do epitélio intestinal em contato com os microorganismos que constituem a microbiota intestinal: (1) enterócitos; (Roop, Gaines *et al.*) células M; (Sun, Zhang *et al.*) células calciformes; (4) células dendríticas e (5) macrófagos. (6) Defensinas, bacteriocinas e IgA secretada (sIgA) exercem importante papel no controle populacional dos microrganismos. Deve ser estabelecido um balanço fino da maturação de células T em direção à T reguladoras (Treg) ou T auxiliares (Thelper) para garantir a resposta tolerogênica do sistema imunológico do hospedeiro. (B) Exemplos de interações moleculares entre antígenos microbianos e células do hospedeiro através de PRRs. LPS, lipopolissacarídeo; PGN, peptidoglicano; dsRNA, RNA de fita dupla; TLR, receptor do tipo toll; NODLR, *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*; RIG-like helicases, *retinoic acid-inducible gene 1 like helicases* (Adaptado de Hevia, 2015).

No entanto, alterações na composição da microbiota induzidas geralmente por mudanças na dieta, tratamentos antibióticos ou por patógenos invasivos, podem perturbar o equilíbrio do microambiente intestinal (homeostase) alterando toda a rede metabólica estabelecida e favorecendo o crescimento de organismos potencialmente patogênicos, esse processo é denominado disbiose. Além disso, a disbiose pode levar a perturbação do processo de regulação imune que normalmente restringe a inflamação intestinal, o que contribui para

geração de doenças inflamatórias intestinais e até mesmo o desenvolvimento de tumores. E ainda mais, pode levar a quebra da barreira epitelial, exacerbando o processo inflamatório, o dano tecidual e aumentando o risco do acometimento sistêmico, uma vez que eleva a possibilidade de translocação bacteriana ou da amplificação desse processo para órgãos distantes (Swank e Deitch, 1996; Macfie, Reddy *et al.*, 2006; Maynard, Elson *et al.*, 2012).

Uma vez que a infecção natural por *Brucella*, por via oral, leva ao acometimento sistêmico do hospedeiro, esse patógeno foi capaz de atravessar as barreiras da mucosa na presença de todo um microambiente colonizado de forma comensal. Portanto, raros trabalhos na literatura abordam a interação entre a *B. abortus*, o microambiente intestinal e a resposta imune resultante na mucosa, e nada se conhece acerca da interação desse patógeno com a microbiota do hospedeiro.

1.6. Inflamassoma no contexto intestinal

As células do epitélio intestinal estão em incessante contato com bactérias benéficas e patogênicas e, para isso, estão idealmente localizadas para vigilância imunológica do lúmen intestinal. Como abordado anteriormente, as IECs expressam TLRs, NLRs e GPCRs que reconhecem componentes microbianos e modulam respostas celulares. A expressão de receptores de reconhecimento de padrões é, também, muito importante para a amplificação da resposta imune frente à microrganismos patogênicos, por promover a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos assim como a indução direta da troca de isotipo de IgA por células B. Portanto, as respostas de IECs à bactérias intestinais não são uniformes: as IECs iniciam seletivamente respostas pró-inflamatórias à bactérias patogênicas enquanto promovem tolerância às simbióticas (Hill e Artis, 2010; Brenchley e Douek, 2012).

Os PRRs inspecionam o espaço extracelular e o citoplasma quanto a invasão de microrganismos ou de dano celular, iniciando as defesas apropriadas. Receptores do tipo NOD (NLRs) e outras proteínas relacionadas representam PRRs citosólicos, alguns dos quais podem formar plataformas multiméricas de sinalização, denominadas inflamassomas, em resposta a diversas injúrias. Diversos inflamassomas diferentes já foram descritos e diferem quanto a sua composição e ligantes (embora estes não sejam completamente conhecidos para todos os casos).

Os estudos mais atuais acerca da sinalização por inflamassomas derivam, principalmente, de experimentos com macrófagos. Nessas células, a ativação do inflamassoma

resulta no recrutamento da proteína adaptadora ASC (*adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*), clivagem proteolítica e ativação de caspase-1, morte celular por piroptose, processamento e liberação das citocinas pró-inflamatórias interleucina-(IL)-1 β e IL-18, além de outros efeitos (Lamkanfi e Dixit, 2014). Bem como existem os inflamassomas não canônicos, envolvendo caspase-4 (caspase-11 em camundongos) e caspase-8, que contribuem, também, para piroptose e liberação de citocinas (Yang, Zhao *et al.*, 2015). Assim, os mecanismos moleculares e as consequências da sinalização de inflamassomas no contexto de macrófagos são extensivamente estudados. Em contraste, os estudos de processos dependentes de inflamassomas em células não hematopoiéticas permanecem escassos.

Atualmente, os principais componentes conhecidos de inflamassomas expressos nas IECs são: NAIPs (NAIP1, 2, 5 e 6 em camundongos; hNAIP em humanos), NLRC4, NLRP1, NLRP3, NLRP6, AIM2, caspase-1, caspase-4/5 (humano), caspase-11 (camundongo), ASC, IL-18 e IL-1 β (Lei-Leston, Murphy *et al.*, 2017). Os inflamassomas possuem papel crítico na homeostase intestinal e na resposta imune de mucosa e sua perturbação ou disfunção pode levar a anormalidades locais severas (como a propensão para disseminação de infecções, autoinflamação intestinal e tumorigênese) com implicações sistêmicas (como a síndrome metabólica) (Elinav, Henao-Mejia *et al.*, 2013).

Altos níveis de expressão de muitas dessas proteínas que compõem os inflamassomas são encontrados na mucosa intestinal em estado normal (*steady-state*), implicando sua importância na manutenção da barreira e no monitoramento imune. Estudos mostram, por exemplo, que durante condições homeostáticas e, portanto, na ausência de resposta inflamatória exacerbada, a citocina dependente da ativação do inflamassoma, IL-18, é liberada das IECs e acredita-se possuir funções de reparo epitelial, proliferação e maturação celular (Elinav, Strowig *et al.*, 2011; Wlodarska, Thaiss *et al.*, 2014). Por outro lado, a deleção de componentes dos inflamassomas está primariamente associada com aumento da susceptibilidade a injúrias e infecções (Lei-Leston, Murphy *et al.*, 2017). Apesar disso, o estudo dos inflamassomas no cenário intestinal ainda é relativamente recente e seus papéis são muitas vezes complexos e controversos e dependem de todo contexto no qual se encontram.

1.7. NLRP6

Em 2002, Grenier e colaboradores publicaram um estudo no qual observaram que a coexpressão da proteína PYPAF5 (*PYRIN-containing apoptotic protease-activating factor-5-*

like protein) com ASC resultou na ativação sinérgica de NF- κ B e de pró-caspase-1. Além disso, observaram o recrutamento de PYPAF5 em estruturas em forma de *puncta* no citoplasma principalmente de granulócitos e células T, indicando o papel dessa proteína na sinalização inflamatória (Grenier, Wang *et al.*, 2002).

Atualmente, PYPAF5 é conhecida oficialmente como NLRP6 (*NLR family pyrin domain containing 6*) e pertence à família de receptores do tipo NOD (NLRs). Quanto a sua estrutura, NLRP6 assemelha-se a NLRP3, possuindo um domínio PYRIN N-terminal, um domínio central NOD (*nucleotide-binding domain*), também conhecido como NACHT, e um domínio LRR (*leucine-rich repeats containing domain*) C-terminal (**Figura 5**).

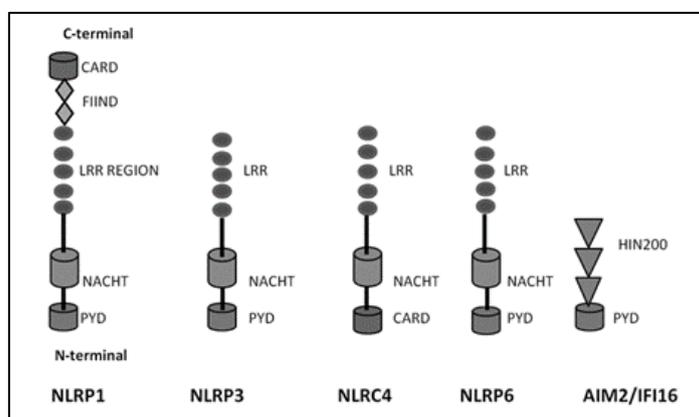


Figura 5 – Estrutura esquemática de importantes receptores formadores de inflamassomas intestinais. Os receptores do tipo Nod: NLRP1, NLRP3, NLRC4 e NLRP6; e AIM2 (Ranson e Eri, 2013).

NLRP6 é altamente expresso no intestino delgado, cólon, fígado, rins e pulmão (Chen, Liu *et al.*, 2011; Elinav, Strowig *et al.*, 2011; Normand, Delanoye-Crespin *et al.*, 2011). No âmbito celular é expresso principalmente em células epiteliais e em células imunes (neutrófilos, células T, macrófagos e células dendríticas) (Grenier, Wang *et al.*, 2002).

Os membros da família de NLRs podem possuir diversas funções, são elas: a capacidade de formar inflamassoma (Henao-Mejia, Elinav *et al.*, 2014; Kayagaki, Stowe *et al.*, 2015), atuação na regulação negativa de vias de sinalização intracelular (Anand, Malireddi *et al.*, 2012; Thaïss, Levy *et al.*, 2016), e, por fim, participação na regulação da imunidade antiviral (Lupfer e Kanneganti, 2013). NLRP6, membro dessa família, é sugerido a impactar em todas as funções citadas.

Atualmente, além da regulação da inflamação e defesa do hospedeiro contra microrganismos, a expressão de NLRP6 em células epiteliais intestinais vem ganhando papel

notável no contexto da homeostase desse órgão. NLRP6 mostrou ser essencial para autorrenovação e proliferação epitelial (Normand, Delanoye-Crespin *et al.*, 2011) além de contribuir para regulação da secreção de muco e produção de peptídeos antimicrobianos, impactando, assim, no processo de colonização da microbiota, na prevenção do desenvolvimento de disbiose, em doenças infecciosas associadas ao microbioma, auto inflamatórias, metabólicas e neoplásicas (**Figura 6**) (Chen, Liu *et al.*, 2011; Chen, 2014; Wlodarska, Thaiss *et al.*, 2014; Levy, Shapiro *et al.*, 2017).

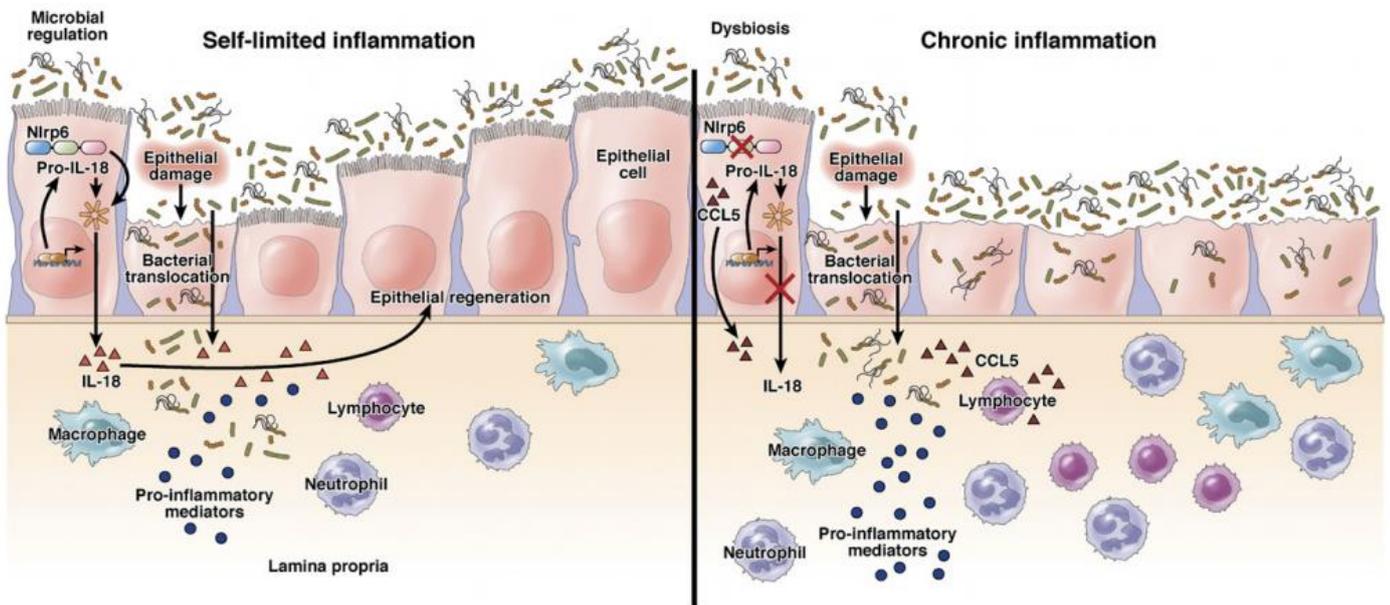


Figura 6 – Inflamassoma Nlrp6 nas células epiteliais do intestino. Nlrp6 mantém a homeostase intestinal através da regulação da composição da microbiota e da produção de IL-18 (à direita). Na ausência de Nlrp6 (à esquerda), há a disbiose, resultando em acumulação de bactérias patobióticas e colitogênicas, regulação positiva de mediadores inflamatórios, como CCL5, inflamação subclínica e o reparo epitelial é prejudicado pela redução da secreção de IL-18 (Nunes e De Souza, 2013).

No entanto, diversos mecanismos atribuídos ao NLRP6 permanecem desconhecidos e/ou discutíveis, como seu papel no intestino envolvendo o reconhecimento, interação e alteração da susceptibilidade do hospedeiro frente à invasão e multiplicação de patógenos, o que precisa ser melhor estudado.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da brucelose ser uma zoonose de escala mundial, acometendo tanto a saúde do homem quanto de animais, os mecanismos envolvidos durante o curso e estabelecimento da infecção natural por *Brucella abortus*, pela via oral, ainda são pouco elucidados. Assim, é de fundamental importância sua compreensão para que novas estratégias terapêuticas possam ser desenvolvidas com intuito de controlar essa zoonose. Além disso, considerando que o processo de invasão de *B. abortus* pela via oral se dá através da mucosa intestinal, e que vários fatores estão envolvidos na manutenção da barreira intestinal, como, por exemplo, o epitélio e a microbiota do hospedeiro, esse trabalho visa compreender e elucidar os mecanismos moleculares exercidos por esses fatores, principalmente no processo inicial de invasão da bactéria durante a infecção. Somado a isso, NLRP6 vem sendo recentemente estudado como um receptor importante na manutenção da homeostase intestinal e na defesa contra patógenos. Assim, este trabalho visa, também, elucidar o papel dessa molécula durante a infecção oral pela *B. abortus* e compreender o impacto da ausência de NLRP6 na barreira epitelial, na microbiota e no controle da infecção, utilizando-se, para tanto, como estratégia experimental animais deficientes para o NLRP6.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar o papel do NLRP6 na manutenção da barreira epitelial e homeostase intestinal durante a infecção oral pela bactéria *Brucella abortus*.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Caracterizar a cinética da infecção da *Brucella abortus* por via oral em modelo murino;

3.2.2. Avaliar os possíveis danos teciduais no intestino após a infecção oral pela bactéria *B. abortus* em camundongos C57BL/6, através da análise histopatológica.

3.2.3. Avaliar a susceptibilidade *in vivo* à infecção pela *B. abortus* por via oral através da determinação do número de unidades formadoras de colônias no baço e fígado de camundongos selvagens C57BL/6 (WT) e deficientes para NLRP6 (Nlrp6^{-/-});

3.2.4. Avaliar a integridade da barreira epitelial intestinal em animais WT e Nlrp6^{-/-} após a infecção por via oral por *B. abortus*;

3.2.5. Comparar a expressão dos transcritos por qPCR de moléculas produtoras de muco MUC1 e MUC2, de Anfirregulina e IL-18, antes e após a infecção oral por *B. abortus* em animais WT e Nlrp6^{-/-};

3.2.6. Avaliar a capacidade do patógeno *B. abortus* de infectar células epiteliais intestinais, por citometria de fluxo;

3.2.7. Caracterizar o perfil da microbiota intestinal dos animais WT e Nlrp6^{-/-} antes e após a infecção a infecção oral por *B. abortus*;

3.2.8. Avaliar o papel da microbiota comensal no processo de infecção oral por *B. abortus* em camundongos WT e Nlrp6^{-/-} através da depleção da microbiota intestinal ou da transferência fecal de animais convencionais para animais *germ-free*;

3.2.9. Comparar o perfil de células inflamatórias (neutrófilos e eosinófilos) intestinais e no sangue periférico durante a infecção oral pela bactéria *B. abortus* em animais WT e Nlrp6^{-/-};

3.2.10. Avaliar a produção de citocinas envolvidas na resposta imune intestinal e formação do inflamassoma como IL-1 β , IL-10, CXCL1/KC, CCL11/Eotaxina e a secreção de sIgA no fluido

intestinal, através do ensaio imunoenzimático de ELISA em animais WT e Nlrp6^{-/-} durante a infecção pela *B. abortus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos com 8 a 12 semanas de idade das linhagens C57BL/6 (WT), Swiss, e deficientes para NLRP6 (Nlrp6^{-/-}) e IL-18 (IL-18^{-/-}). Animais WT e Nlrp6^{-/-} (estes doados pela Universidade de Massachusetts, Worcester, EUA) foram criados no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB/UFMG. E camundongos Swiss e IL-18^{-/-} foram gentilmente cedidos pela professora Dra. Leda Quércia Vieira do Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG, e posteriormente mantidos em nosso biotério. Animais isentos de microbiota (*germ-free*) foram mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Madison, EUA) e transferidos para microisoladores para os procedimentos experimentais e manuseados de acordo com técnicas estéreis já bem estabelecidas. 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. Os procedimentos para experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais - CEUA/UFMG sob protocolo número 273/2017.

4.2. Bactéria, condições de cultivo e infecção *in vivo* dos animais

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 e, após quantificação, estavam prontas para uso.

Para preparo do inóculo, a bactéria foi crescida em meio BB por 24 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm, lavadas em PBS por 10 minutos, 4800 rpm a 4°C e ressuspendidas em PBS estéril.

Para as infecções por via oral, os camundongos foram infectados através de gavagem intragástrica com 100 µL contendo 1x10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. abortus*. Para infecção sistêmica, os camundongos foram infectados por via intraperitoneal com 100 µL contendo 1x10⁶ UFC de *B. abortus*. Já para infecção pulmonar, os animais foram

infectados por via intratraqueal com 25 μL contendo 1×10^6 UFC de *B. abortus*. Em todos os casos, animais controle receberam volume equivalente de solução salina pela via correspondente.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 , seguido de deslocamento cervical, em diferentes tempos de infecção (0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 7 dias) para a retirada dos seguintes órgãos: intestino delgado, cólon, fígado e baço e, também, coleta do fluido intestinal, sangue, fezes e lavado broncoalveolar (no caso da infecção pulmonar).

4.3. Ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo*

O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificação da função de barreira foi realizado utilizando-se o método adaptado de FITC-labeled dextran (Yan, Kolachala *et al.*, 2009). Alimento e água foram removidos e, após 3 horas, os camundongos foram pesados e receberam inoculação intragástrica de FITC-dextran (0,6 mg/g de peso corporal, PM 4000; Sigma-Aldrich, EUA). Quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (Syntec, Brasil) (0,6 mL de cetamina na concentração de 100 mg/mL, 0,4 mL de xilazina na concentração de 20 mg/mL e 4 mL de salina), o sangue retirado por punção cardíaca e, posteriormente, eutanasiados. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos à 4°C e o soro coletado foi pipetado no volume de 100 μL /poço em placa de 96 poços (Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA). A medida da intensidade de fluorescência de cada amostra (excitação, 492 nm; emissão, 525 nm; Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., EUA) foi realizada. A medida da permeabilidade intestinal foi expressa como média da unidade de fluorescência.

4.4. Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC)

O baço e fígado extraídos de cada animal foram macerados em solução salina (NaCl 0,9%), na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de tecido, com o auxílio de pequenas telas de aço e diluídos serialmente. As diluições foram plaqueadas em duplicata, em meio BB (*Brucella Broth*) ágar. As placas foram incubadas à 37°C e a contagem de UFC foi realizada 3 dias após o plaqueamento. Os resultados foram expressos como a média de UFC por miligrama de tecido.

4.5. Análise Histopatológica

O intestino delgado e cólon dos animais foram removidos logo após o sacrifício e ambos os tecidos foram estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Esses fragmentos foram transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-fixação. O material pré-fixado foi colocado sobre uma superfície plana e enrolado em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocambolos). Os rolos amarrados com linha foram fixados por imersão em solução de 10% formol em PBS, pH 7.4. Após tempo mínimo de fixação por 48 horas, os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo de 4 µm de espessura e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os cortes foram examinados ao microscópio óptico e fotografados.

4.6. PCR em tempo real

4.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA: Para avaliação da expressão de transcritos de moléculas envolvidas na manutenção da barreira epitelial, foi extraído o RNA total de cortes do intestino delgado através do protocolo de extração TRIzol® (Invitrogen, Brasil) com auxílio de homogeneizador de tecidos (T10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Alemanha). O RNA total foi quantificado através do DeNovix® DS-11 Spectrophotometer (Uniscience, Brasil) e apenas amostras com razões 260/230 nm e 260/280 nm entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas para síntese de cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando os seguintes reagentes: 1 µL de RNA total à 4000 ng/µL, 9,5 µL de água ultrapura® (Qiagen, Brasil), 2,0 µL de oligodT, 2,0 µL de dNTPs, 4,0 µL Buffer 5X, 0,5 µL Ribolock RNase Inhibitor e 1,0 µL RevertAID® Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Esta etapa foi realizada no termociclador Peltier Thermal Cycler (Biocycler) com programação de 42°C por 30 minutos e 70°C por 5 minutos.

4.6.2. Desenho dos Primers: A sequência dos exons dos genes de interesse foi retirada do banco de dados *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). As sequências foram colocadas no programa *Primer3 v.0.4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/>),

restringindo-se o tamanho do produto a 70-150 bases; tamanho do iniciador entre 19-21 bases; temperatura de *melting* entre 59-61°C e conteúdo GC variando entre 40-60%. Em seguida os pares de iniciadores obtidos foram avaliados através do programa *NetPrimer* (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) para evitar pares com grandes defeitos estruturais. Por fim, as sequências com menores defeitos estruturais foram analisadas no banco de dados *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). O tamanho do transcrito a ser amplificado e a especificidade dos iniciadores foram avaliados.

Apenas os iniciadores com poucos erros estruturais e específicos para o gene foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil). As sequências dos iniciadores para IL-18 e Anfirregulina foram retiradas dos trabalhos realizados por Hu e colaboradores (2015) e Canesso e colaboradores (2017) respectivamente. Os demais *primers* foram desenhados conforme descrito acima e suas sequências estão disponíveis na **tabela 2**.

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados na realização da curva de diluição e na quantificação relativa por PCR em tempo real. Genes de referência escolhidos para normalizar os dados (β -actina, *beta-actin*; e Gapdh, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e genes alvo (Muc 1, *mucin 1*; Muc 2, *mucin 2*, Anfirregulina, *Amphiregulin*; e IL-18, interleucina-18) estão representados no sentido 5' → 3'.

Gene	Forward	Reverse
β-actina	GTGGGAATGGGTCAGAAGG	GGTCATCTTTTCACGGTTGG
Gapdh	AGGAGCGAGACCCCACTAAC	GTGGTTCACACCCATCACAA
Muc1	GAAGACCCCAGCTCCAATA	TCCCCAGAAAATCTCCGTTA
Muc2	CACCAACACGTCAAAAATCG	CGCAGAACTCCAGTAGCA
Anfirregulina	GCCATTATGCAGCTGCTTTGGAGC	TGTTTTTCTTGGGCTTAATCACCT
IL-18	GCCTCAAACCTTCCAAATCA	TGGATCCATTTCTCAAAGG

4.6.3. Reação de PCR em tempo Real: As reações foram realizadas no equipamento CFX 96TM Real Time system (BioRad, EUA). A primeira etapa consistiu na realização da curva de diluição em 6 concentrações (40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng e 1,25 ng/ μ L) para cada gene analisado, pipetadas em triplicata. Padronizou-se a concentração de 10 ng/ μ L de cDNA para a quantificação. Em todas as reações foram utilizados 5 μ L do agente intercalante SYBR

green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 1 µL de cDNA (nas concentrações já especificadas para a curva e a 10 ng para quantificação), 0,4 µL da solução de *primers* e 8,2 µL de água ultrapura. Foi utilizado um controle negativo (NTC) em todas as reações e o volume da reação mantido em 15 µL. O protocolo adotado apresentava os seguintes parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e, para o estágio de dissociação, 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos. A captação da fluorescência foi feita na temperatura de 60°C, última etapa de cada ciclo. A eficiência das reações de amplificação foi calculada pelo software BioRad CFX Manager® (BioRad) e o valor aceitável foi estipulado entre o intervalo de 95-105% entre os genes de referência e os genes alvos. Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Genética Animal e Humana do Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.6.4. Normalização dos dados de PCR em tempo real: A análise da expressão diferencial de transcritos foi calculada pelo método $\Delta\Delta C_t$ utilizando a média geométrica dos genes de referência *Gapdh* e *β -actina* conforme Vandesompele (2002). A média aritmética das amostras do grupo controle foi utilizada como fator calibrador para o cálculo das quantidades relativas dos outros grupos, considerando a eficiência real da curva de diluição para cada gene. Ademais, para cada gene, um controle negativo (NTC, *non-template control*) e uma curva de *melting* foram examinados.

4.7. Infecção de células epiteliais intestinais murinas pelo patógeno *B. abortus*

4.7.1. Isolamento das células do epitélio intestinal: Para avaliação da capacidade de *B. abortus* infectar células epiteliais intestinais murinas e sua relação com a presença de NLRP6, foi utilizado o protocolo de isolamento para esse tipo celular, segundo Gracz e colaboradores (2012), com algumas modificações, como descrito a seguir.

Camundongos WT, *Nlrp6*^{-/-} e *IL-18*^{-/-} foram infectados através de gavagem intragástrica com 100 µL contendo 1x10⁹ UFC de *B. abortus*-GFP (cepa S2308 que expressa proteína fluorescente verde). Os animais foram eutanasiados, após 72 horas de infecção, o intestino delgado removido e separado do mesentério e do excesso de gordura com ajuda de tesoura e lâmina de bisturi. O órgão foi colocado em uma placa de Petri e foi realizada a lavagem do conteúdo intestinal com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) (Sigma) gelado. O intestino foi cortado longitudinalmente, expondo o lúmen, lavado novamente e incubado, em

tubo de polipropileno de 50 mL, por 20 minutos no gelo em 10 mL de Reagente de Dissociação 1# [47 mL DPBS, 3 mL de EDTA 0,5 M (30mM) (Sigma), 75 µL de DTT 1 M (1,5 mM) (Sigma)]. Com auxílio de fórceps o intestino foi removido e adicionado a 10 mL de Reagente de Dissociação 2# [47 mL DPBS, 3 mL de EDTA 0,5 M (30mM) (Sigma)] incubado à 37°C por 10 minutos. Em seguida, o tubo contendo o intestino foi agitado por 30 segundos (para liberação do epitélio da membrana basal) e o tecido remanescente (camada muscular e submucosa) foi removido. A solução foi centrifugada à 1.000 x g por 5 min à 4°C, o sobrenadante removido e as células dissociadas foram lavadas em 10 mL de DPBS com 10% SFB. A solução foi novamente centrifugada, removido sobrenadante e as células ressuspensas em 10 mL de DPBS contendo Liberase (0,13 mg/mL) (Liberase TL Research Grade, Roche, Suíça), incubada por 10 minutos em banho-maria à 37°C (agitando o tubo a cada 2 minutos de incubação). Foi adicionado 10% de SFB e 20 U/mL de DNase I (GE Healthcare, EUA) à solução celular que, sem seguida, foi submetida a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 µm (BD Biosciences) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula remanescentes. As células foram lavadas mais uma vez para retirada da Liberase e ressuspensas em 4 mL de meio RPMI (LifeCare, Inc, EUA).

4.7.2. Citometria de Fluxo: As células obtidas, de acordo com a sessão anterior, foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços contendo 5×10^5 células por poço. Primeiramente, as células foram centrifugadas por 7 minutos, 1.500 rpm à 4°C e foi utilizado o kit Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (BioLengend, EUA) para avaliação da viabilidade celular, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente a 1500 rpm, 4°C por 7 minutos e posteriormente lavadas com PBS. As células foram então centrifugadas novamente, seguindo as mesmas condições, e incubadas com Fc Block (1:30 diluído em PBS suplementado com 0,5% BSA) por 20 minutos a 4°C. Por fim, as células foram centrifugadas e lavadas em tampão PBS 1% BSA, foi adicionado o anticorpo monoclonal de rato anti-camundongo CD326/Ep-CAM conjugado a PE-Cy7 (clone G8.8; 1:100) (BioLegend), foram centrifugadas e lavadas em PBS 1% BSA e ressuspensas em PBS. A avaliação foi realizada no equipamento Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies, EUA) e os resultados analisados pelo software FlowJo (Tree Star, EUA).

4.8. Análise do perfil da microbiota intestinal

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a coleta do fluido intestinal e fezes do intestino delgado, ceco e cólon, em quantidades proporcionais, para análise da microbiota intestinal. Realizada de forma estéril, as amostras foram pesadas e diluídas serialmente em PBS e semeadas através da técnica de espalhamento em superfície utilizando alças descartáveis. O espalhamento foi realizado nos seguintes meios de cultura enriquecidos, seletivos e/ou diferenciais: Ágar Sal Manitol — para isolamento de Estafilococos —; Ágar MacConkey (MAC) — seletivo para Enterobactérias —; *Brucella* Broth (BB) — cultivo de *Brucella* spp. e outros micro-organismos exigentes —; Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) com Azida Sódica — isolamento de Enterococos —; Ágar Sangue — base rica, fornece condições de crescimento para diversos microrganismos inclusive *Streptococcus* spp. —; Ágar MRS Lactobacilos — cultivo de Lactobacilos e Bifidobactérias —; e Bacteroides Bile Esculina (BBE) — cultivo de Bacteroides. As placas foram incubadas na presença ou ausência de oxigênio, à 37°C, e a contagem de UFC foi realizada 3-4 dias após o plaqueamento. Os resultados foram expressos como a média de UFC por miligrama de fezes.

4.9. Transplante da microbiota intestinal para animais *germ-free* por convencionalização

Animais convencionalmente alojados (convencionais) de ambos os grupos (WT e Nlrp6^{-/-}) foram previamente infectados por *B. abortus*, por via oral, e após 72 horas de infecção suas fezes foram coletadas de forma estéril, pesadas e homogeneizadas em solução salina (0,9%) (100 mg de fezes para cada 1 mL de solução). 100 µL da suspensão de fezes foi administrada a camundongos isentos de germe por gavagem oral. Após 3 dias de transplante os animais foram eutanasiados e coletados soro, fezes, intestinos, fígado e baço para análises posteriores.

4.10. Depleção da microbiota intestinal por meio de coquetel de antibióticos

Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram tratados com coquetel de antibióticos de amplo espectro, na água de beber, durante 21 dias anteriores à experimentação (Vieira, Macia *et al.*, 2015). O tratamento iniciou com 3 dias de anfotericina-B (0,1 mg/mL, a cada 12 horas) dada por gavagem. Durante todo o período os frascos de água foram suplementados com um coquetel

composto por ampicilina 2 g/L, neomicina 2 g/L, metronidazol 1 g/L e vancomicina 0,5 g/L. Além disso, todos os camundongos receberam injeção intraperitoneal de ciprofloxacina 0,2 g/L. Não houve crescimento bacteriano em pellets de fezes coletados e tratados assepticamente no dia 21 em meio Tioglicolato (o limite de detecção para esse ensaio foi ajustado para 1 UFC/mg de fezes). Apenas animais com CFU/mg de fezes menos que 1 foram definidos como depletados com sucesso e usados nos experimentos. Os animais foram mantidos em condições estéreis durante os 21 dias e durante todo o período experimental.

4.11. Medida da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. O protocolo de dosagem dessa enzima em tecidos previamente homogeneizados foi realizado com algumas modificações (Vieira, Fagundes *et al.*, 2009). Sumariamente, fragmentos de intestino delgado e cólon dos animais foram removidos e congelados a -80°C. Após o descongelamento, o tecido foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA) (100 mg de tecido em 1,0 mL de tampão), utilizando-se homogeneizador de tecidos, centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando Tetramethylbenzidine (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Multiskan FC Thermo Scientific, EUA).

4.12. Medida da atividade da Peroxidase Eosinofílica (EPO)

A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido foi utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia intestinal (Vieira, Fagundes *et al.*, 2009). Para

tanto, para cada 100 mg de tecido pesado (intestino delgado e cólon), foi adicionado 1,0 mL de PBS 5X (pH 7.2), em seguida o tecido foi homogeneizado, no homogeneizador de tecidos, e centrifugado a 10.000 rpm (12.000 g) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente utilizadas e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuspendido em 1,0 mL de PBS (pH 7.4), contendo HTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide; Sigma) 0,5%, para cada 100 mg de amostra. Dessa solução foi recolhida uma alíquota de 1 mL e transferida para um microtubo de 1,5 mL, seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, 75 µL por poço de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) foi incubada com 75 µL de substrato [*o*-fenilenodiamina (OPD) (Sigma) 1,5 mM, em tampão Tris-HCl - 0,075 µM, pH 8, suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura ocorreu em leitor de microplacas (Multiskan FC Thermo Scientific, EUA) com filtro de 492 nm.

4.13. Contagem total de leucócitos circulantes

Para contagem das células sanguíneas, os animais foram sacrificados por anestesia (cetamina/xilazina) seguida de deslocamento cervical e 20 µL de sangue foram recolhidos do plexo braquial e adicionados a 180 µL de solução de Turk para a contagem total de leucócitos circulantes utilizando câmara de Neubauer.

4.14. Dosagem de citocinas

Para avaliação da produção de citocinas, fragmentos do intestino delgado e cólon com aproximadamente 100 mg foram homogeneizados, utilizando-se homogeneizador de tecidos (T10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Alemanha), em 1mL de solução de extração de citocinas - PBS contendo coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram imediatamente

coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem. A dosagem das citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-10, CXCL1-3/KC, CCL11/Eotaxina foi realizada pelo método de ELISA de captura utilizando os kits adquiridos da R&D Systems (DuoSet) (R&D Systems, EUA), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

4.15. Dosagem de sIgA

O intestino delgado foi removido, pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo intestinal foi retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2, suplementada com inibidores de protease (1 μ M de aprotinina; 25 μ M de leupeptina; 1 μ M de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 rpm por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para posterior dosagem de imunoglobulina A. sIgA total do fluido intestinal foi determinada utilizando anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabra (M-8769, Sigma Chemical Co., EUA), para revestimento das placas e, anticorpos desenvolvidos em cabra, anti-IgA de camundongo, conjugados com peroxidase (A-4789, Sigma Chemical Co., EUA) para detecção. A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, EUA). A leitura foi feita a 492 nm em um leitor de microplacas (Multiskan FC Thermo Scientific, EUA), e a concentração de sIgA foi dada em μ g/mL de conteúdo intestinal.

4.16. Contagem de UFC no lavado broncoalveolar (LBA)

Para avaliar a carga bacteriana resultante da infecção pulmonar por *B. abortus*, os animais de ambos os grupos foram infectados por via intratraqueal com 25 μ L contendo 10⁶ UFC da bactéria. Após 0 e 72 horas de infecção os camundongos foram eutanasiados e a lavagem broncoalveolar foi realizada pela inserção e coleta, por três vezes, de 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) utilizando um cateter de 1,7 mm em seringa de 1 mL. O lavado resultante foi diluído serialmente e plaqueado em meio BB (*Brucella Broth*) ágar. As placas foram incubadas à 37°C e a contagem de UFC foi realizada 3 dias após o plaqueamento. Os resultados foram expressos como a média de UFC por mililitro de LBA.

4.17. Análise estatística

Todos os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os dados foram comparados usando análise de variância (ANOVA) seguida por um pós-teste de Student-Newman-Keuls utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Foram considerados significativos resultados em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

B. abortus é capaz de atravessar a barreira epitelial e estabelecer infecção sistêmica em um modelo de infecção por via oral?

5.1. Caracterização da cinética de infecção por via oral por *Brucella abortus* em camundongos C57BL/6

A caracterização da cinética de infecção por via oral pela bactéria *B. abortus* foi realizada através do ensaio de permeabilidade intestinal e da contagem de unidades formadoras de colônias no fígado e baço dos animais C57BL/6 (WT) após 0 (não infectado), 24, 48, 72 horas e 7 dias de infecção pelo patógeno, administrado por gavagem intragástrica.

Foi observada uma tendência de aumento de permeabilidade da barreira epitelial intestinal nos animais infectados durante 24 e 48 horas em relação aos animais controle não infectados (0h) (**Figura 7**). Um pico expressivo de aumento da permeabilidade intestinal foi observado nos camundongos infectados por 72 horas e, reduzido, posteriormente, após 7 dias de infecção.

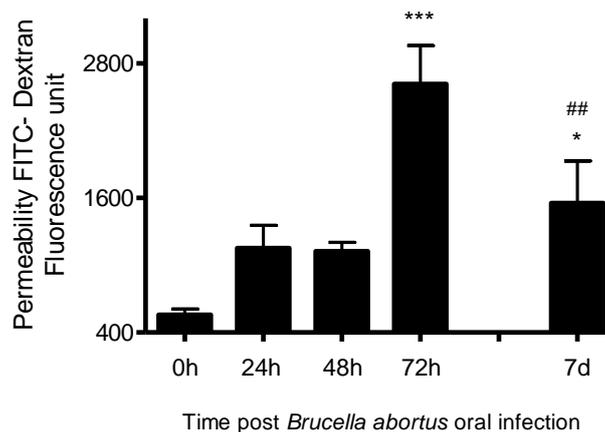


Figura 7 – Cinética da permeabilidade intestinal de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela *B. abortus*. O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificação da função de barreira foi realizado utilizando-se o método do fluxo de FITC-labeled dextran. Sua fluorescência foi mensurada no soro de animais da linhagem C57BL/6 infectados, através de gavagem intragástrica, por 1×10^9 UFC de *B. abortus*. Foram avaliados os tempos de 0h (animais controle não infectados), 24h, 48h, 72h e 7 dias de infecção. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05; ***p < 0,001 comparado com 0h, ## p < 0,01 comparado com 72h.

Em relação ao estabelecimento de infecção sistêmica nos animais infectados por via oral pela *B. abortus*, foi possível recuperar a bactéria viável em ambos os órgãos e em todos os tempos de infecção avaliados. No fígado, com 24 horas de infecção, já ocorre um aumento significativo da carga bacteriana que permanece constante após 48 e 72 horas e decresce, naturalmente, após 7 dias de infecção (**Figura 8A**). No baço, por sua vez, há um pico de infecção no órgão após 48 horas decaindo nos tempos subseqüentes (**Figura 8B**).

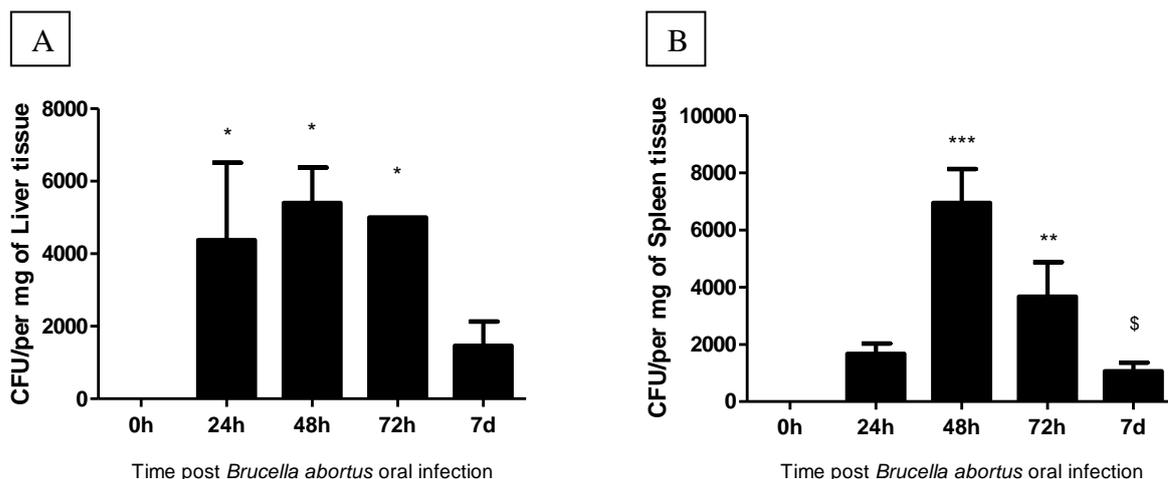


Figura 8 – Cinética da carga bacteriana no fígado e baço de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela *B. abortus*. Animais C57BL/6 foram infectados, através de gavagem intragástrica, por 1×10^9 UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0h (não infectados), 24h, 48h, 72h e 7 dias de infecção. Fígado (A) e baço (B) foram coletados e processados para avaliação do título de bactérias viáveis através da contagem de UFC. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 comparado com 0h, \$p < 0,05 comparado com 48h.

5.2. Caracterização do dano tecidual no intestino de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela *Brucella*

A caracterização do dano tecidual resultante no intestino dos animais, após infecção por via oral pela bactéria *B. abortus*, foi realizada em camundongos C57BL/6. Os animais foram infectados e fragmentos de duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletados, após 0 (não infectado), 48 e 72 horas de infecção para processamento e análise histopatológica.

Como representado pelas micrografias apresentadas na **Figura 9**, foi observado dano tecidual, resultante da infecção por *B. abortus*, em todos os fragmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) analisados. Os fragmentos da porção inicial do intestino delgado (duodeno) foram os mais comprometidos apresentando características como achatamento de vilosidade, infiltrado inflamatório, áreas de necrose e fibrose, vasos hiperemiados e hiperplasia

das placas de Peyer. Também, de forma interessante, foi possível observar eosinofilia intestinal (Figura 9B).

Em contrapartida, não foram observadas alterações histopatológicas nos fragmentos de cólon analisados.

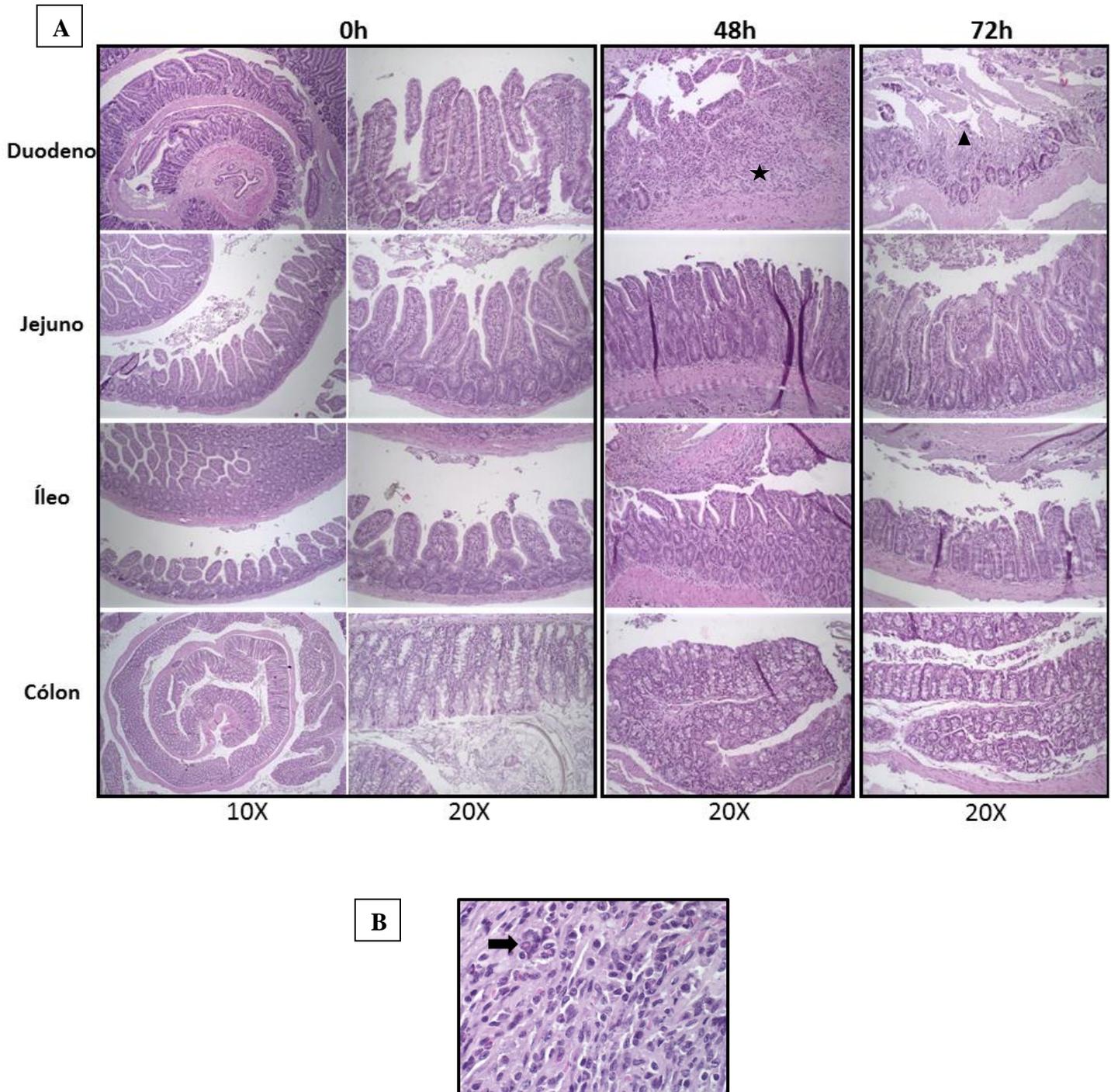


Figura 9 – Dano tecidual no intestino de camundongos C57BL/6 após infecção por via oral pela *B. abortus*. Animais C57BL/6 foram infectados, através de gavagem intragástrica, por 1×10^9 UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0 (não infectados), 48 e 72 horas de infecção. Fragmentos de duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletados para processamento e análise histopatológica. (A) Estrela indicando área de infiltrado inflamatório, necrose, fibrose e vasos hiperemiados; Triângulo indicando achatamento de vilosidade. (B) Eosinófilos intestinais em 48 horas de infecção, exemplo apontado pela seta (60X).

Visto que *B. abortus* foi capaz de atravessar a barreira epitelial, gerar dano tecidual e estabelecer uma infecção sistêmica no nosso modelo de infecção oral, qual seria, portanto, o papel da molécula NLRP6 na susceptibilidade do hospedeiro frente a infecção por *B. abortus*?

5.3. Avaliação da susceptibilidade *in vivo* à infecção oral por *Brucella abortus* em camundongos WT versus Nlrp6^{-/-}

O papel da molécula NLRP6 em relação à susceptibilidade à infecção por via oral por *B. abortus* foi avaliado através da determinação do número de unidades formadoras de colônias no fígado e baço de camundongos selvagens (WT) e deficientes para NLRP6 (Nlrp6^{-/-}) após 48h e 72h de infecção e não infectados 0h.

De forma interessante, foi observado que no fígado dos animais WT o número de bactérias recuperadas foi superior ao recuperado nos camundongos Nlrp6^{-/-}, tanto em 48 quanto 72 horas de infecção (**Figura 10**).

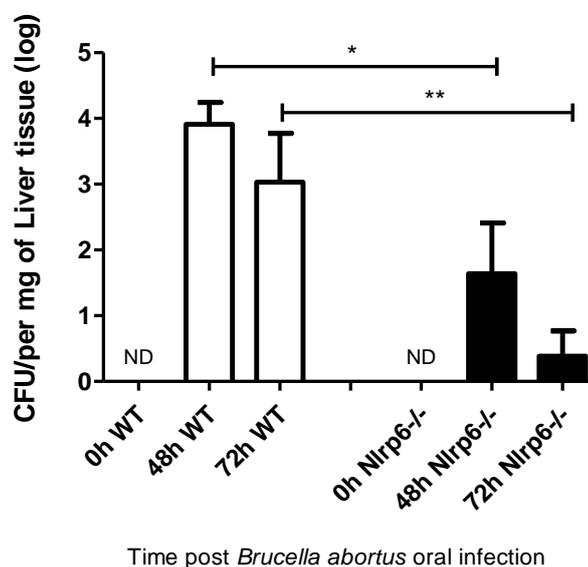


Figura 10 – Cinética da carga bacteriana no fígado de camundongos WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção por via oral pela *B. abortus*. Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados, através de gavagem intragástrica, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0h (não infectados), 48h e 72h de infecção. O fígado dos animais foi coletado e processado para avaliação do título de bactérias viáveis através da contagem de UFC. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05; **p < 0,01.

No baço, não foram encontradas diferenças significativas na carga bacteriana recuperada entre os dois grupos de animais infectados (WT e Nlrp6^{-/-}) em todos os tempos de infecção avaliados (dados não mostrados).

De maneira interessante, foi observado que o fenótipo de resistência dos animais Nlrp6^{-/-} não foi visto quando a infecção se procede por via sistêmica, através da inoculação de *Brucella abortus* por via intraperitoneal, no tempo de 72 horas. Como resultado, observamos de forma intrigante que, no fígado, os animais Nlrp6^{-/-} apresentaram a contagem de UFC similar aos animais WT (**Figura 11**), diferentemente do que foi observado na infecção por via oral (**Figura 10**). Para o baço, a similaridade de carga bacteriana entre os grupos foi mantida. Esses dados reforçam a hipótese de que a molécula NLRP6 é importante no processo de invasão do patógeno e controle da barreira intestinal do hospedeiro durante o processo inicial da infecção.

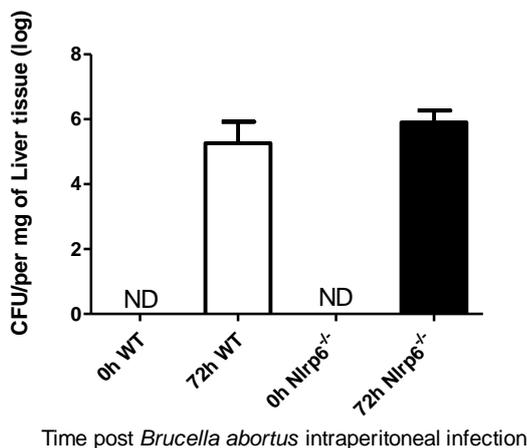


Figura 11 – Contagem de UFC no fígado de camundongos WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção por via intraperitoneal por *B. abortus*. Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados, por via intraperitoneal (i.p), por 1x10⁶ UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0h (não infectados) e 72h de infecção. O fígado dos animais foi coletado e processado para avaliação do título de bactérias viáveis através da contagem de UFC. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7).

Uma vez observada uma menor susceptibilidade dos animais deficientes em NLRP6 em relação aos animais selvagens, infectados exclusivamente por via oral pelo patógeno B. abortus, quais os fatores do hospedeiro (barreira epitelial x microbiota) poderiam estar envolvidos nesse fenótipo?

5.4. Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal em animais WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção por via oral por *B. abortus*

O papel de NLRP6 na manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal frente à infecção pela *Brucella* foi avaliado através do método do fluxo de FITC-labeled dextran em animais WT e Nlrp6^{-/-} após 72 horas de infecção oral pela bactéria.

Observamos que diferentemente do que ocorreu nos animais WT, nos quais a infecção levou ao aumento da permeabilidade da barreira epitelial (visto através do aumento de FITC-dextran no soro dos animais em diferentes tempos após a infecção oral), nos animais Nlrp6^{-/-} não foi observado alteração da permeabilidade intestinal no tempo de infecção avaliado (**Figura 12**).

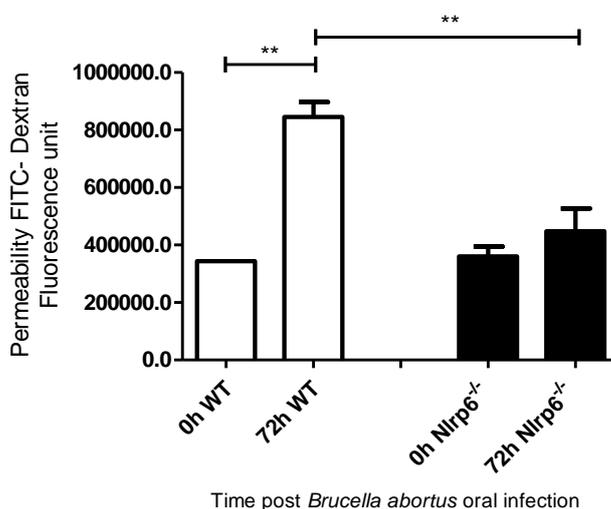


Figura 12 – Permeabilidade intestinal de camundongos WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção oral por *B. abortus*. O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificação da função de barreira foi realizado utilizando-se o método do fluxo de FITC-labeled dextran. Sua fluorescência foi mensurada no soro de animais WT e Nlrp6^{-/-} infectados, através de gavagem intragástrica, por 1×10^9 UFC de *B. abortus*. Foram avaliados os tempos de 0h (animais controle não infectados) e 72h de infecção. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). **p < 0,01.

Visto que NLRP6 parece estar envolvido no aumento da permeabilidade da barreira epitelial intestinal em resposta a infecção, quais fatores poderiam estar sendo regulados nesse processo?

5.5. Avaliação da expressão dos transcritos de MUC1, MUC2, Anfirregulina e IL-18 após infecção por via oral por *B. abortus*

O papel de NLRP6 na regulação de outros fatores que poderiam levar a alteração da integridade da barreira epitelial intestinal, frente à infecção por *B. abortus*, foi investigado através da avaliação da expressão de transcritos das moléculas: Mucina 1 (MUC1) e Mucina 2 (MUC2), produtoras de muco, participam da primeira camada de defesa contra invasão de patógenos (Gill, Wlodarska *et al.*, 2011); Anfirregulina, crítica para regeneração epitelial intestinal (Shao e Sheng, 2010); e Interleucina-18 (IL-18), citocina importante na promoção da regeneração epitelial e ativação de peptídeos antimicrobianos (Levy, Thaiss *et al.*, 2015).

Observamos que para ambas as moléculas relacionadas à produção de muco, MUC1 e MUC2, os animais deficientes em NLRP6 possuem naturalmente a expressão reduzida de seus transcritos em relação a de animais selvagens, como observado no tempo de 0h (**Figura 13A e 13B**). A infecção por *Brucella sp.* induziu uma redução da expressão de MUC1 apenas nos animais WT, não havendo alterações da expressão de MUC1 e MUC2 antes e após a infecção nos animais *Nlrp6*^{-/-}.

Quanto a expressão de Anfirregulina e IL-18, a infecção por *B. abortus* levou ao aumento dos transcritos de ambas as moléculas após a infecção como observado nos animais selvagens (**Figura 13C e 13D**). Nos animais *Nlrp6*^{-/-} não foram observadas alterações na expressão de Anfirregulina (**Figura 13C**). Porém, camundongos *Nlrp6*^{-/-} apresentaram redução da expressão de IL-18 após infecção pela bactéria quando comparados com o seu grupo não infectado e, também, comparados com o grupo de animais WT infectados (**Figura 13D**).

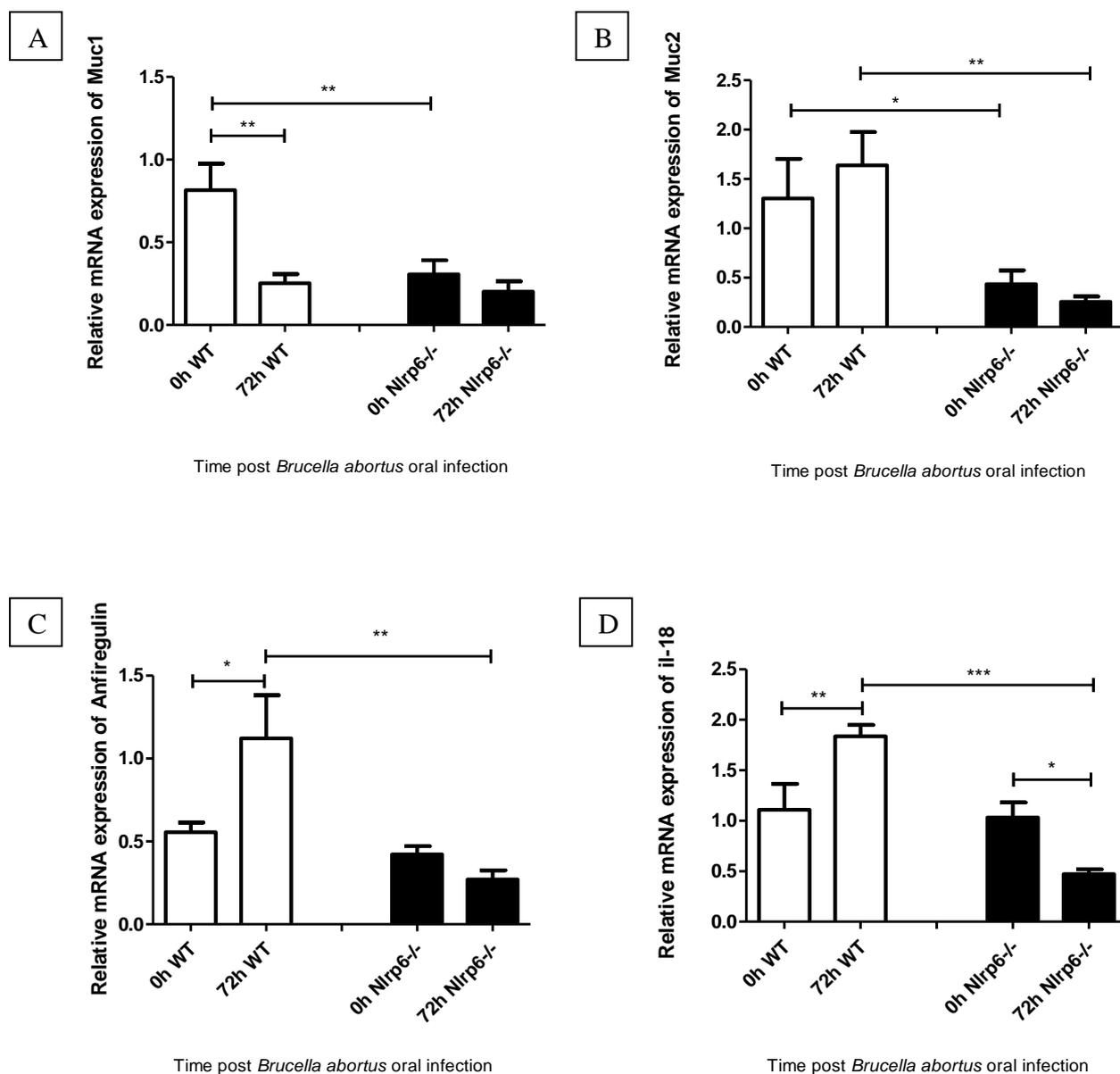


Figura 13 – Expressão de transcritos das moléculas MUC1, MUC2, Anfiregulina e IL-18 em intestino delgado de camundongos WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção oral por *B. abortus*. A avaliação da participação de NLRP6 na regulação da expressão de Mucina 1 (MUC1), Mucina 2 (MUC2), Anfiregulina e IL-18 após infecção por via oral por *B. abortus* foi realizada através do ensaio de qPCR de cortes do intestino delgado de animais WT e Nlrp6^{-/-} infectados, através de gavagem intragástrica, por 1×10^9 UFC de *B. abortus*. Foram avaliados os tempos de 0h (animais controle não infectados) e 72h de infecção. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 comparado com WT 0h.

A indução de IL-18 intestinal pela microbiota é dependente da ativação do inflamassoma NLRP6 (Levy, Thaiss *et al.*, 2015). Tendo em vista o papel importante de IL-18 no contexto intestinal, e sua expressão diferencial entre os grupos após a infecção, foi realizado um experimento inicial de infecção em animais deficientes em Interleucina-18.

De forma interessante, foi observado uma tendência de redução da carga bacteriana nesses animais em relação aos WT (Figura 14).

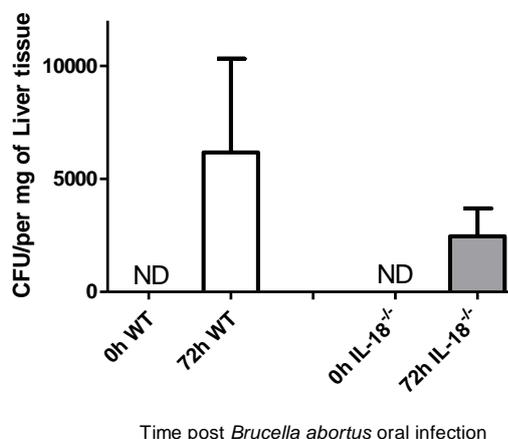


Figura 14 – Contagem de UFC no fígado de camundongos WT versus IL-18^{-/-} após infecção oral por *B. abortus*. Animais WT e deficientes para IL-18 foram infectados, por via oral, por 1×10^9 UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0h (não infectados) e 72h de infecção. O fígado dos animais foi coletado e processado para avaliação do título de bactérias viáveis através da contagem de UFC. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados representam apenas 1 experimento.

*Uma vez observada que a barreira epitelial intestinal parece ser importante durante a infecção in vivo pela *B. abortus*, qual a capacidade dessa bactéria de infectar exclusivamente as células epiteliais do intestino?*

5.6. Avaliação *ex vivo* do potencial de infecção de *B. abortus* em células epiteliais intestinais murinas

Na literatura, estudos acerca da infecção por *Brucella abortus* em células epiteliais intestinais foram realizados apenas *in vitro* utilizando linhagens de células epiteliais humanas imortalizadas, como Caco-2 e HT-29 (Ferrero, Fossati *et al.*, 2012). Para avaliação da capacidade de *B. abortus* infectar *in vivo* as células da barreira epitelial intestinal de camundongos e sua relação com a presença ou ausência de NLRP6, um experimento inicial foi realizado utilizando animais WT, Nlrp6^{-/-} e IL-18^{-/-}. Esses foram infectados por via oral pela bactéria fluorescente verde (*B. abortus*-GFP) e após 72 horas de infecção o intestino delgado foi coletado para isolamento das células epiteliais (CD326⁺) através de digestão mecânica e

enzimática. As células isoladas foram analisadas, posteriormente, quanto a viabilidade celular e presença/ausência da bactéria (*B. abortus*⁺) através da técnica de citometria de fluxo.

De forma interessante e complementar aos resultados obtidos anteriormente, observamos que *B. abortus* foi capaz de infectar as células epiteliais intestinais (CD326⁺) dos camundongos de todos os grupos utilizados (**Figura 15A e 15B**). Tendo como base de correção a porcentagem de células CD326⁺ totais (infectadas e não infectadas) (**Figura 15C**), os resultados indicam que os animais WT apresentaram a maior porcentagem de células epiteliais positivas para *Brucella*, tanto células CD326⁺ totais infectadas (**Figura 15A**) quanto células CD326⁺ viáveis infectadas (**Figura 15B**). Os animais deficientes para NLRP6, por sua vez, apresentaram redução na porcentagem de células CD326⁺ totais infectadas e de células CD326⁺ viáveis infectadas, em relação a WT. Por fim, a resposta celular dos animais IL-18^{-/-} foi similar à de Nlrp6^{-/-} apresentando redução da porcentagem de células infectadas tanto totais quanto viáveis, comparadas ao WT.

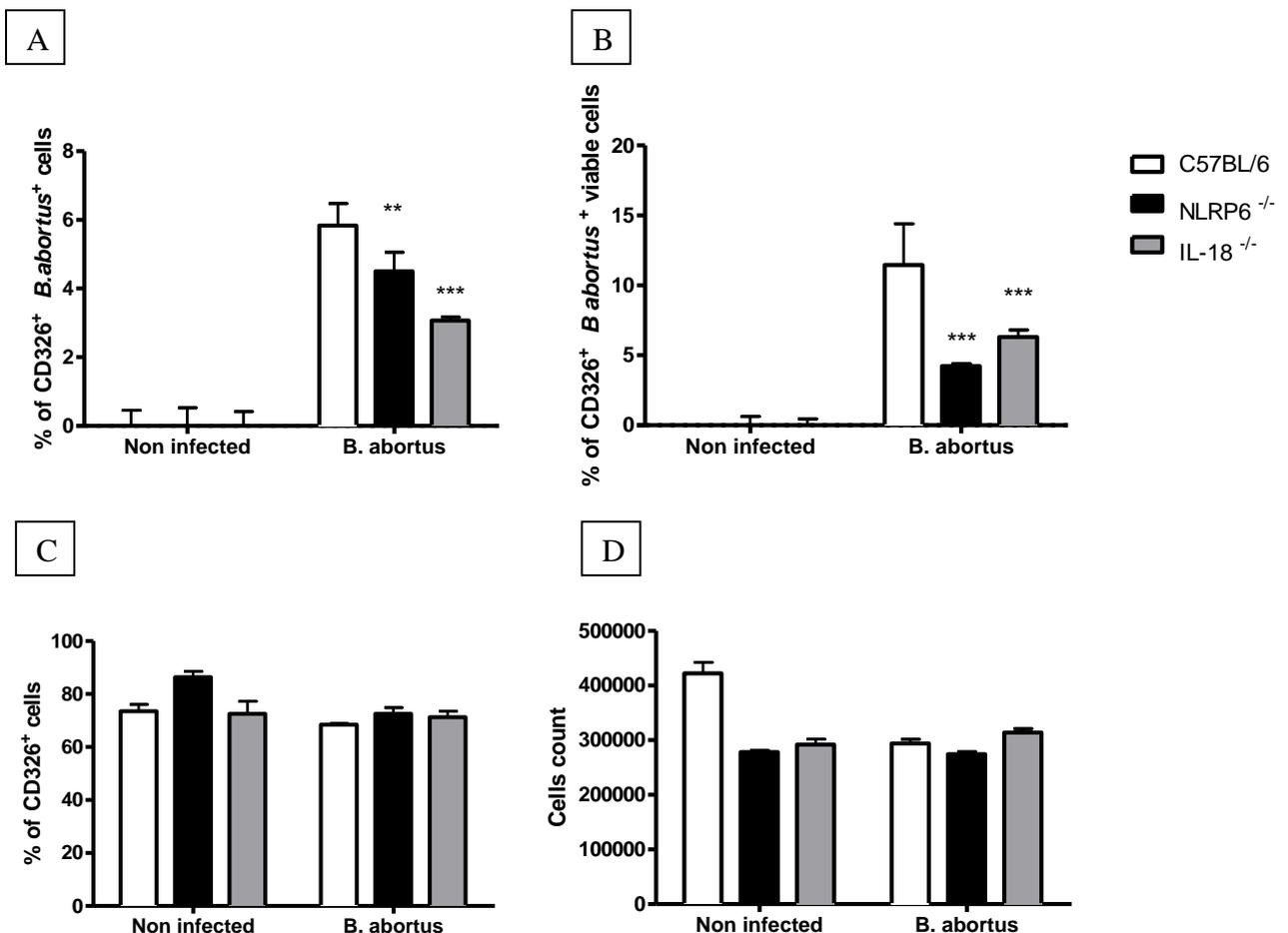


Figura 15 – Infecção de *B. abortus* em células epiteliais intestinais murinas. Animais WT, deficientes para NLRP6 (Nlrp6^{-/-}) e deficientes para IL-18 (IL-18^{-/-}) foram infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus*-GFP e sacrificados após 0h (não infectados) e 72h de infecção. O intestino delgado dos animais foi coletado e

processado para o isolamento de células epiteliais. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o kit Zombie (Biolegend) e a marcação das células epiteliais utilizando o anticorpo anti-mouse CD326 conjugado a PE-Cy7. As células foram avaliadas no aparelho *Attune Acoustic Focusing* (Life Technologies) e os resultados analisados pelo software *FlowJo* (Tree Star, Ashland). Porcentagem de células totais CD326⁺ *B. abortus*⁺ (**A**), porcentagem de células CD326⁺ *B. abortus*⁺ viáveis (**B**), porcentagem de células CD326⁺ totais (**C**) e contagem total de células (**D**). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 1). Os dados representam apenas 1 experimento.

Observamos que a barreira epitelial parece ser um fator relevante do hospedeiro relacionado ao fenótipo de resistência dos animais NLRP6 KO. E quanto a microbiota? Qual seria seu papel diante da infecção por via oral por Brucella?

5.7. Avaliação do perfil da microbiota intestinal em animais WT e Nlrp6^{-/-} após infecção por via oral por *B. abortus*

Afim de investigar se a infecção por *Brucella* é capaz de alterar o perfil bacteriano da microbiota intestinal, animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados com *B. abortus*, por gavagem intragástrica, e após 0 e 72 horas de infecção foi realizada a coleta representativa de todo o conteúdo intestinal para as análises através de cultivo meio-dependente.

Foi observado, que o perfil da microbiota dos animais WT, em condições normais (não infectado), foi diferente daquele observado nos animais deficientes para NLRP6 (grupos 0h, não infectados) tanto em relação ao crescimento de bactérias aeróbias quanto anaeróbias (**Figuras 16 e 17**).

No que se refere ao crescimento de bactérias aeróbias, que possuem menor prevalência no intestino saudável em condições normais, foi observado que para ambos os grupos (WT e Nlrp6^{-/-}) a infecção por *Brucella* levou ao aumento da quantidade total desses microrganismos (**Figura 16A**). Em relação a diversidade de bactérias aeróbias, a infecção levou a redução da diversidade nos animais WT (**Figuras 17A.1 e 17A.2**) mas não nos animais Nlrp6^{-/-} (**Figuras 17A.3 e 17A.4**).

Já em relação as bactérias anaeróbias, que representam grande parte da microbiota intestinal comensal, foi observado que a infecção levou a redução do número total de bactérias nos animais WT (**Figura 16B**) e, nos animais Nlrp6^{-/-} a infecção levou a um discreto aumento da quantidade total de bactérias. Para ambos os grupos a infecção por *B. abortus* levou a redução da diversidade bacteriana, com perda de grupos importantes como Bacteroides, Bifidobactérias e Lactobacilos (**Figura 17B**).

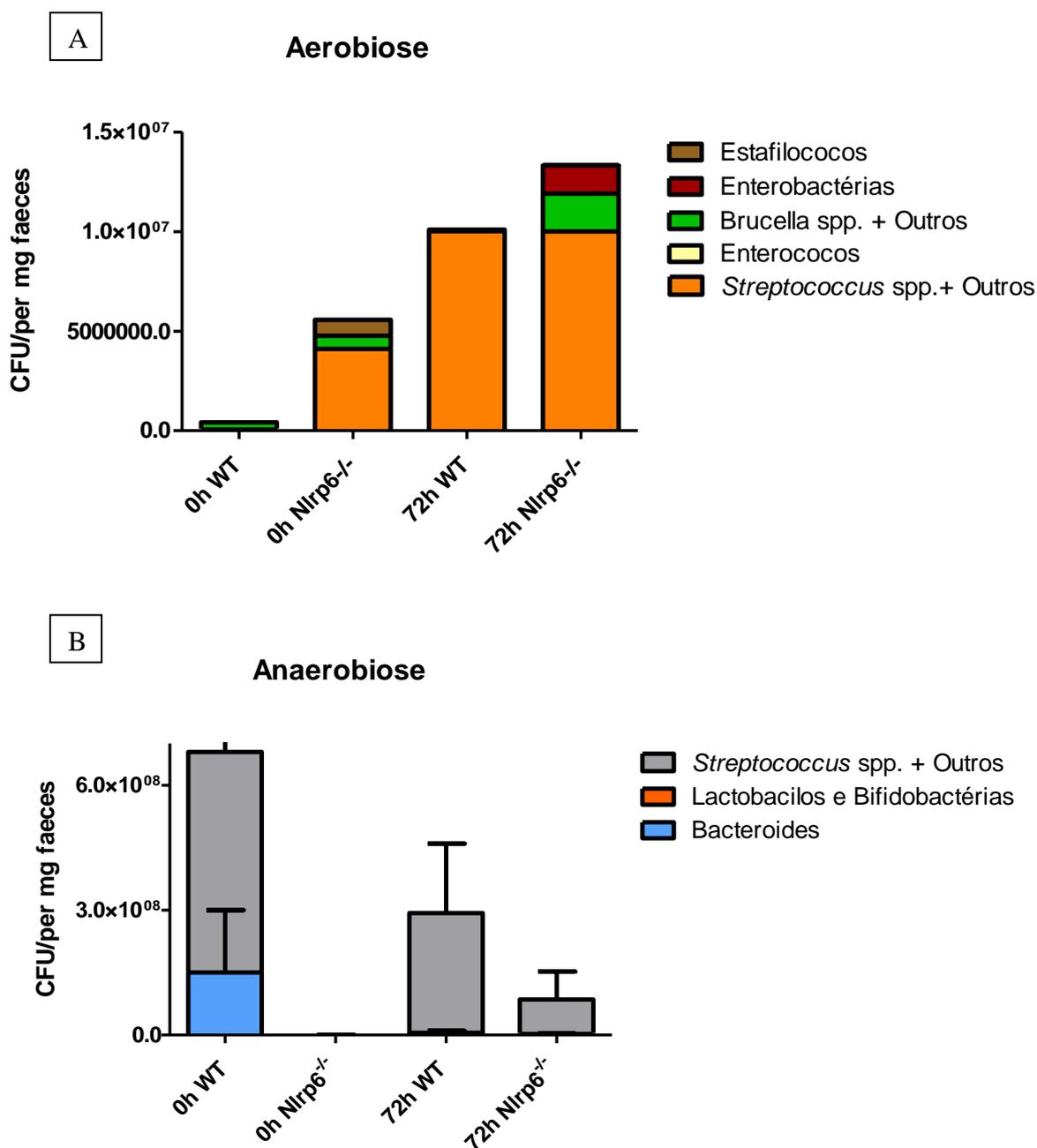


Figura 16 – Perfil quantitativo da microbiota intestinal cultivável de animais WT e Nlrp6^{-/-} após infecção oral por *B. abortus*. Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0h (não infectados) e 72h de infecção. Foi realizada a coleta do conteúdo intestinal e as amostras foram processadas e cultivadas em meios de cultura enriquecidos, seletivos e/ou diferenciais na presença ou na ausência de oxigênio à 37°C por 3-4 dias. (A) Aerobiose, (B) Anaerobiose. Resultados expressos como UFC/mg de fezes. (n = 5 - 7).

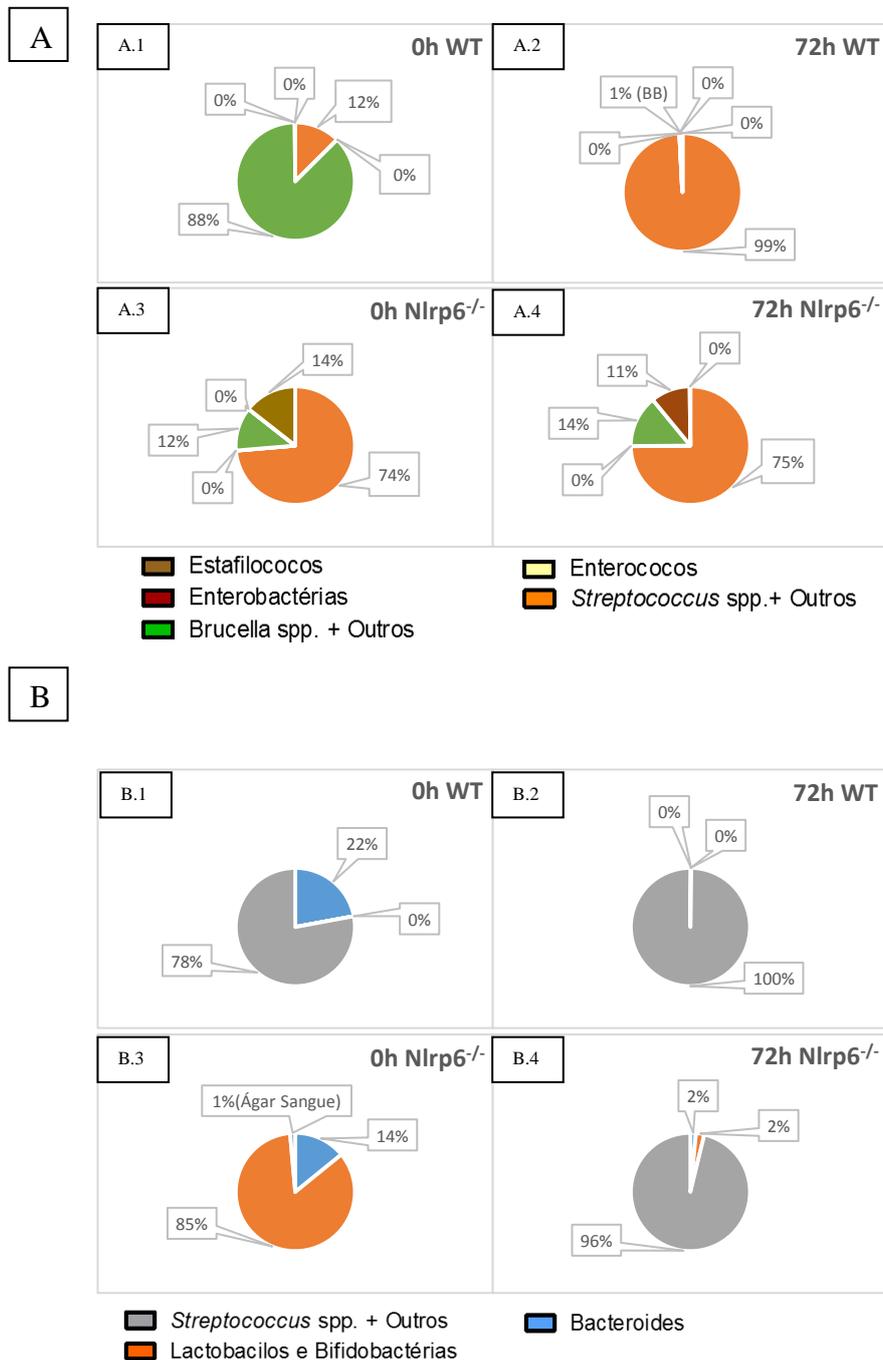


Figura 17 – Perfil qualitativo da microbiota intestinal cultivável de animais WT e Nlrp6^{-/-} após infecção oral por *B. abortus*. Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0h (não infectados) e 72h de infecção. Foi realizada a coleta do conteúdo intestinal e as amostras foram processadas e cultivadas em meios de cultura enriquecidos, seletivos e/ou diferenciais na presença ou na ausência de oxigênio à 37°C por 3-4 dias. **(A)** Aerobiose, **(B)** Anaerobiose. Resultados expressos como porcentagem de grupos representativos de bactérias por grupo animal experimental. (n = 5 - 7).

Visto que a infecção por *Brucella abortus* levou a alteração do perfil da microbiota do hospedeiro, qual seria a importância dessa microbiota para o fenótipo de permeabilidade intestinal observado anteriormente?

5.8. Avaliação da permeabilidade intestinal de camundongos *germ-free* receptores da microbiota de animais WT e *Nlrp6*^{-/-} infectados por *B. abortus*

Como observado anteriormente, a infecção por *B. abortus* levou ao aumento da permeabilidade intestinal nos animais WT, o que não ocorreu com os camundongos *Nlrp6*^{-/-} (Figura 12). Para avaliar o papel da microbiota na diferença do fenótipo de permeabilidade intestinal observada entre os grupos, frente à infecção, animais WT e *Nlrp6*^{-/-} foram infectados por *B. abortus*, por via oral, e após 72 horas de infecção suas fezes (microbiota) foram coletadas de forma estéril, processadas e administradas à camundongos isentos de germe por gavagem oral, como esquematizado na figura 18. Os grupos doadores infectados e não infectados estão também representados na figura. Após 3 dias de transplante foi realizada a avaliação da permeabilidade intestinal em todos os animais.

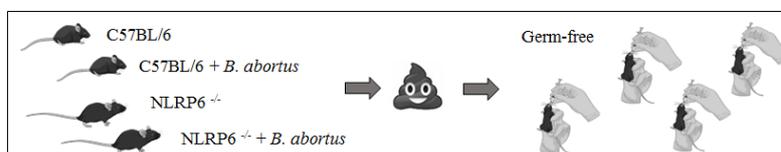


Figura 18 – Representação esquemática do procedimento de transplante da microbiota intestinal de animais convencionais para animais *germ-free*.

Como resultado, foi observado que de forma análoga ao fenótipo observado anteriormente em animais WT, o qual a infecção levou ao aumento da permeabilidade intestinal, animais GF que receberam a microbiota de animais WT não infectados (0hWT > GF) não alteraram a permeabilidade, enquanto animais GF que receberam a microbiota de WT infectados (72hWT > GF) exibiram uma tendência de aumento de permeabilidade intestinal.

De forma equivalente, animais GF que receberam a microbiota tanto de animais *Nlrp6*^{-/-} não infectados quanto *Nlrp6*^{-/-} infectados (0h*Nlrp6*^{-/-} > GF e 72h*Nlrp6*^{-/-} > GF, respectivamente) não apresentaram alteração da permeabilidade intestinal.

Foi observada diferença significativa entre o aumento de permeabilidade dos animais WT infectados (72hWT) daqueles GF que receberam suas fezes (72hWT > GF).

Por fim, animais isentos de microbiota não apresentaram alteração significativa da permeabilidade intestinal após 72h de infecção por *B. abortus* (72h GF) (**Figura 19**).

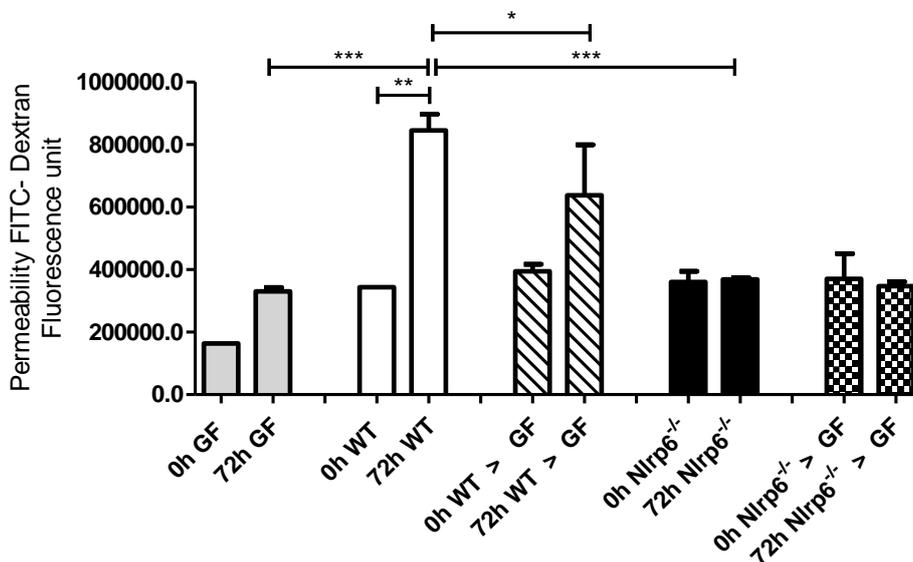


Figura 19 – Permeabilidade intestinal de camundongos *germ-free* transplantados com a microbiota de animais WT e Nlrp6^{-/-} infectados por *B. abortus*. O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificação da função de barreira foi realizado utilizando-se o método do fluxo de FITC-labeled dextran. Sua fluorescência foi mensurada no soro dos animais. Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus*. Após 72 horas de infecção, as fezes dos animais de ambos os grupos foram coletadas, processadas e administradas por gavagem intragástrica à animais GF não infectados. Após 72 horas de transplante fecal foi realizada a avaliação da permeabilidade intestinal em todos os grupos. (0h) animais não infectados, (grupo doador da microbiota > *germ-free* receptor). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Sabendo-se, então, que a microbiota está envolvida na manutenção da permeabilidade intestinal, qual seria, portanto, o fenótipo dos animais frente à infecção por B. abortus ao depletarmos sua microbiota comensal?

5.9. Avaliação do papel da microbiota intestinal sobre os fenótipos de permeabilidade e susceptibilidade *in vivo* após infecção por *B. abortus* em animais WT versus Nlrp6^{-/-}

Afim de investigar o papel da microbiota intestinal relacionado ao fenótipo de resistência inicial à *Brucella* nos animais, foi realizada a depleção da microbiota de camundongos WT e NLRP6 KO através do uso de coquetel de antibióticos de amplo espectro

durante 21 dias consecutivos. Após a confirmação da depleção, os animais foram infectados por *B. abortus* e, após 72 horas de infecção, foram realizados ensaio de permeabilidade intestinal e contagem da carga bacteriana no tecido hepático.

Em relação aos animais WT – para os quais foi observado anteriormente que a infecção levou ao aumento da permeabilidade e da carga bacteriana no fígado (Figuras 12 e 10, respectivamente) –, verificou-se que com a depleção da microbiota a infecção não mais alterou a permeabilidade intestinal nesses animais (72h WT *depleted*) (Figura 20A). Além disso, a depleção da microbiota reduziu de forma significativa a quantidade de bactérias no fígado dos animais WT infectados por *B. abortus*, comparados aos WT convencionais infectados (72h WT) (Figura 20B).

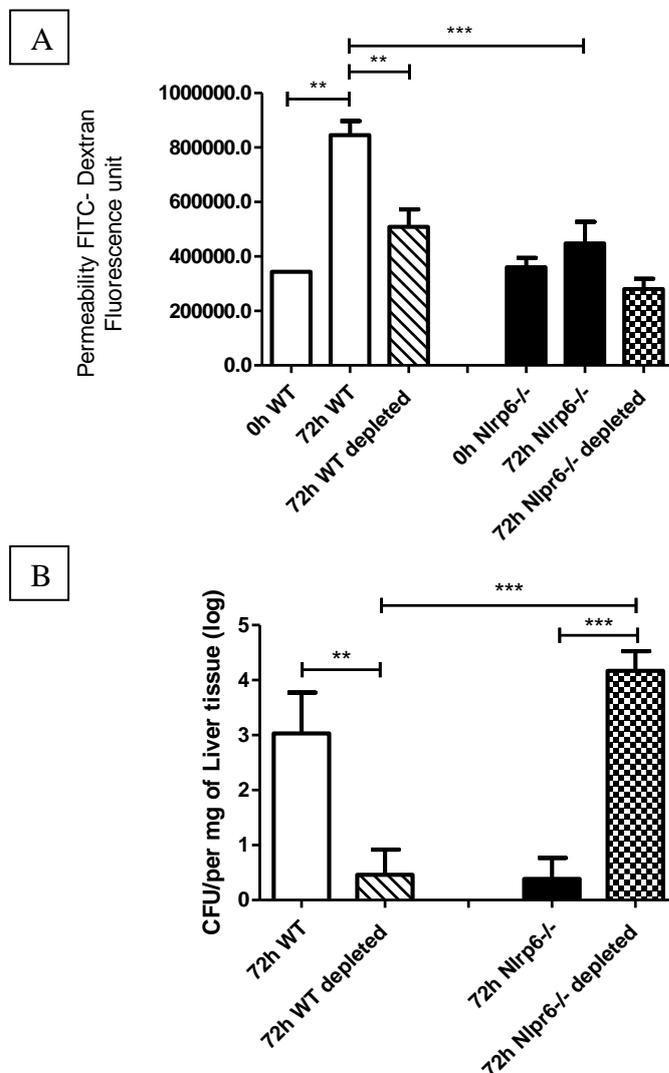


Figura 20 – Permeabilidade intestinal e Carga bacteriana hepática em camundongos WT e Nlrp6^{-/-}, com microbiota depletada, infectados por *B. abortus*. Animais WT e deficientes para Nlrp6^{-/-} receberam tratamento com coquetel de amplo espectro de antibióticos durante 21 dias consecutivos para depleção da microbiota. Os animais depletados foram infectados, por via oral, com 1x10⁹ UFC de *B. abortus*. Após 72 horas de infecção, foi

realizada a avaliação da permeabilidade intestinal (**A**) e a contagem de UFC no fígado (**B**). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). **p < 0,01; ***p < 0,001.

Já em relação aos animais $Nlrp6^{-/-}$ – para os quais foi observado anteriormente que a infecção não alterou a permeabilidade intestinal, e a carga bacteriana no fígado foi menor que a dos WT (**Figuras 12 e 10**, respectivamente) –, verificou-se, de forma surpreendente, que a infecção nos animais deficientes para NLRP6 com ausência de microbiota (72h $Nlrp6^{-/-}$ *depleted*) levou ao aumento expressivo da carga bacteriana no fígado desses animais, em relação aos $Nlrp6^{-/-}$ convencionais (**Figura 20B**), ainda que a permeabilidade intestinal dos animais tenha permanecido inalterada (**Figura 20A**).

Uma vez observado que tanto a barreira epitelial quanto a microbiota intestinal parecem ser importantes para o fenótipo de resistência dos animais Nlrp6^{-/-}, como seria a resposta inflamatória intestinal nesses animais frente à infecção oral por Brucella?

5.10. Avaliação do perfil celular intestinal e sistêmico após infecção por *B. abortus* em animais WT versus Nlrp6^{-/-}

A inflamação é uma resposta do hospedeiro definida por células imunes que infiltram os tecidos afetados e tem papel central na mediação da defesa do hospedeiro contra patógenos, reparo tecidual e restauração da homeostase (Rathinam e Chan, 2018). Afim de investigar se a resposta inflamatória poderia ser um dos fatores envolvidos no fenótipo distinto observado entre os grupos frente à infecção por *B. abortus*, foi avaliado o perfil de células da imunidade inata (neutrófilos e eosinófilos) por meio dos ensaios enzimáticos de MPO e EPO, respectivamente.

Apesar de não ser estatisticamente significativo, foi observado que animais WT infectados (48h WT e 72h WT) apresentaram tendência de aumento de EPO no intestino delgado e de MPO no intestino delgado e cólon, em relação aos animais controle não infectados (0h WT) (**Figura 21 A, B, C e D**).

Animais deficientes para NLRP6 infectados por 48 horas (48h Nlrp6^{-/-}) exibiram, tanto no intestino delgado quanto no cólon, aumento de EPO quando comparados ao grupo não infectado (0h Nlrp6^{-/-}) (**Figuras 21A e 21B**). Adicionalmente, foi observada redução de EPO nos animais Nlrp6^{-/-} após 72 horas de infecção (72h Nlrp6^{-/-}), em relação aos animais infectados no tempo de 48 horas (48h Nlrp6^{-/-}). Quanto à medida de MPO, os animais Nlrp6^{-/-} infectados por 48 horas (48h Nlrp6^{-/-}) exibiram aumento de MPO observado no cólon (**Figuras 21D**).

Também foi realizada a contagem total de leucócitos circulantes no sangue dos animais de ambos os grupos (WT e Nlrp6^{-/-}) para avaliação da inflamação sistêmica. Como resultado, foi observado que os animais WT infectados nos dois tempos avaliados (48h WT e 72h WT) não apresentaram alteração da contagem total de leucócitos circulantes quando comparados ao grupo controle não infectado (0h WT) (**Figura 21E**). Os animais deficientes para NLRP6, por sua vez, apresentaram aumento do número de células após 48 horas de infecção (48h Nlrp6^{-/-}) por *Brucella* spp. (**Figura 21E**).

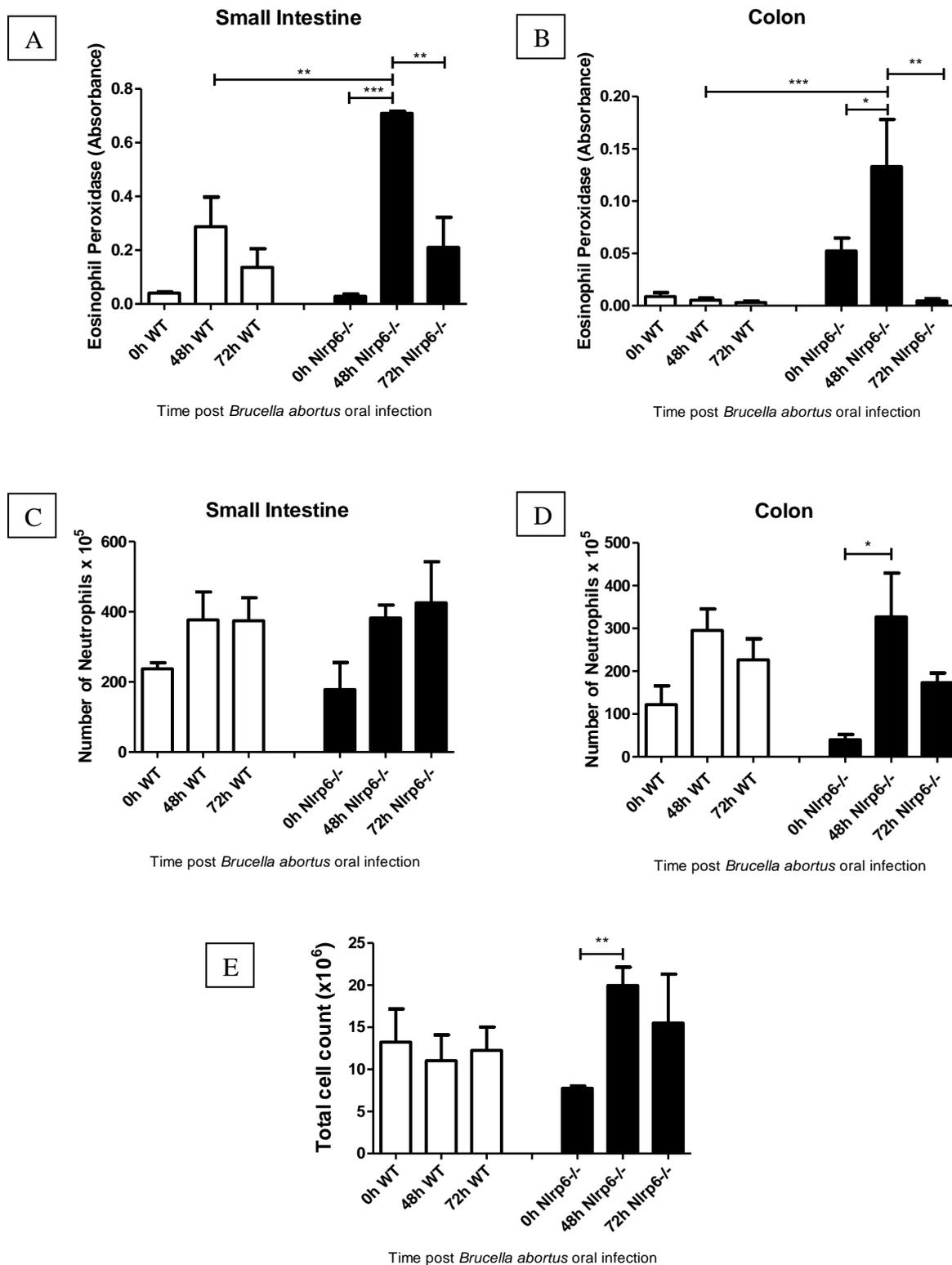
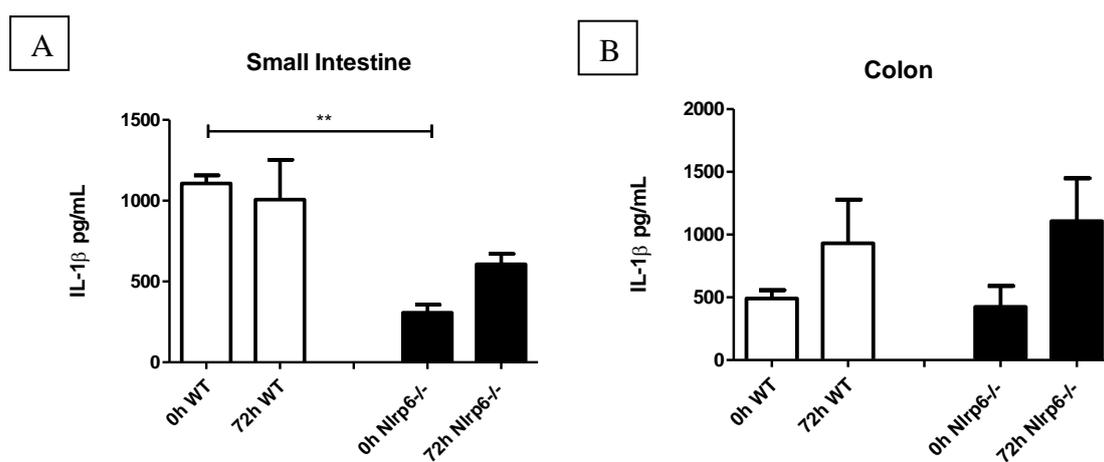


Figura 21 – Perfil celular intestinal e sistêmico após infecção por *B. abortus* em animais WT versus *Nlrp6*^{-/-}. Animais WT e *Nlrp6*^{-/-} foram infectados, por via oral, com 1×10^9 UFC de *B. abortus*. Após 0 (não infectados), 48 e 72 horas de infecção, foram coletados intestino delgado, cólon e sangue para medida de EPO (A e B), MPO (C e D) e contagem total de leucócitos circulantes (E). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). **p < 0,01; ***p < 0,001.

5.11. Avaliação da produção de citocinas no tecido intestinal de animais WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção por *B. abortus*

Os mediadores inflamatórios podem atuar alterando a integridade da mucosa intestinal já que influenciam os diversos componentes de defesa da mucosa (Martin e Wallace, 2006). Citocinas e quimiocinas são componentes integrais da resposta imune intestinal, as primeiras estão envolvidas em uma variedade de processos imunológicos, inflamatórios e infecciosos enquanto as quimiocinas têm papel principal de guiar a migração de células específicas (Tekin, Oral *et al.*, 2015).

Foi avaliada a participação de NLRP6 na produção das seguintes citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta imune intestinal e formação do inflamassoma: IL-1 β – citocina pró-inflamatória secretada a partir da ativação de inflamassomas possuindo papel importante na defesa contra patógenos e, também, na manutenção do balanço homeostático intestinal e na regeneração do epitélio (Rathinam e Chan, 2018) –; IL-10, citocina que possui papel supressor das respostas inflamatórias inatas e adaptativas e estimulador de circuitos regulatórios (Kole e Maloy, 2014) –; e CXCL1/KC e CCL11/Eotaxina – quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, que contribuem na resposta à patógenos e tecidos danificados que podem resultar de infecções focais (Hogan, Waddell *et al.*, 2013).



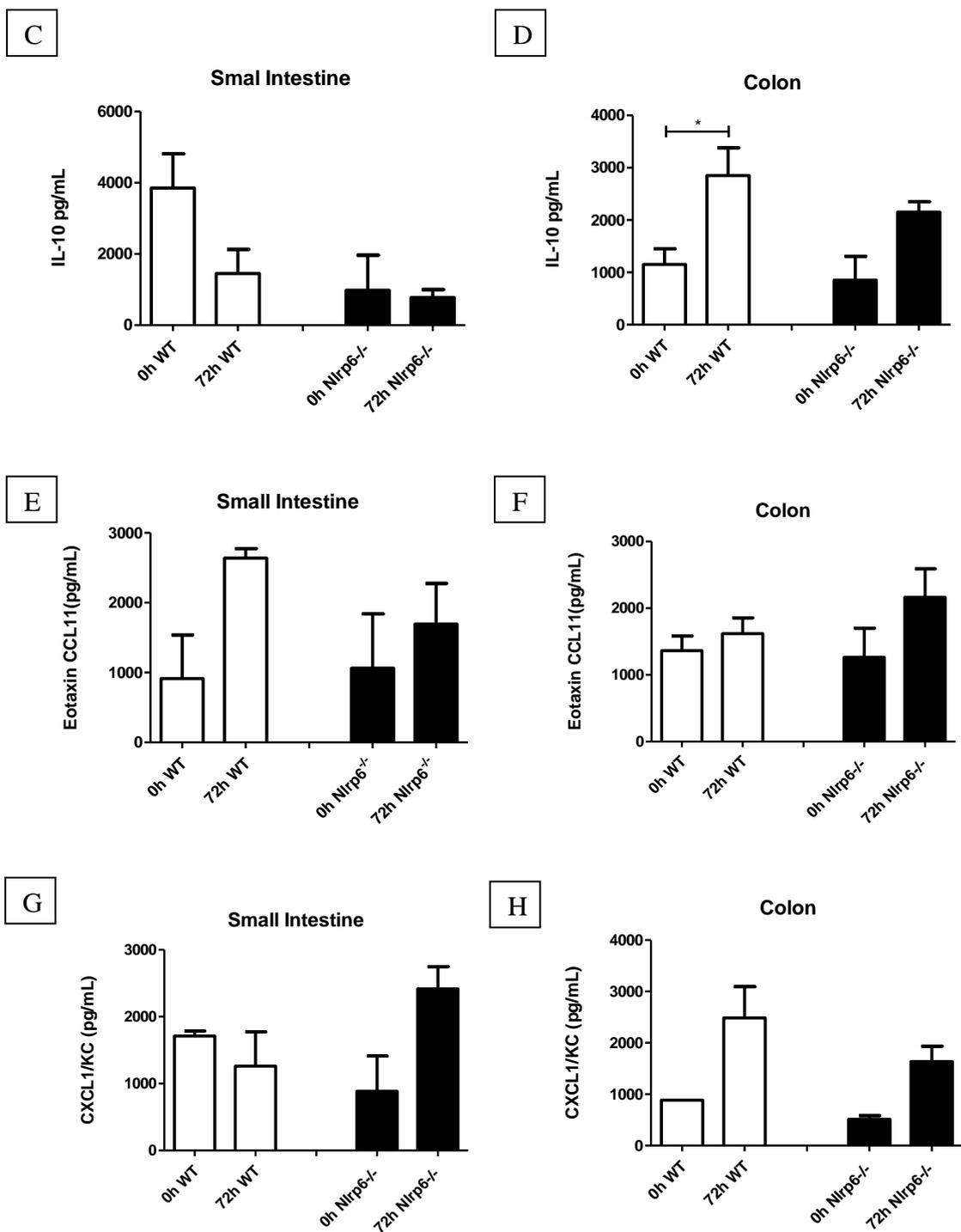


Figura 22 – Produção de citocinas e quimiocinas no tecido intestinal de animais WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção oral por *B. abortus*. Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados, por via oral, com 1x10⁹ UFC de *B. abortus*. Após 0 (não infectados) e 72 horas de infecção, foram coletados intestino delgado e cólon para processamento e avaliação da produção de IL-1 β (A e B), IL-10 (C e D), CCL11/Eotaxina (E e F) e CXCL1/KC (G e H) por ELISA. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05.

Foi observado que a infecção por *Brucella* levou ao aumento de IL-10 no cólon dos animais WT comparados aos animais não infectados (**Figura 22D**). Além disso os

camundongos deficientes para NLRP6 não infectados apresentaram redução da produção de IL-1 β no intestino delgado em relação aos animais WT não infectados (**Figura 22A**). Quanto a produção dos outros mediadores inflamatórios avaliados não observamos alterações estatisticamente significativas.

5.12. Dosagem de Imunoglobulina (Ig) A secretada, após infecção por *B. abortus*, em animais WT versus NLRP6 KO

A IgA secretada (sIgA) atua classicamente como a primeira linha de defesa na proteção do epitélio intestinal contra microrganismos patogênicos e toxinas entéricas (Mantis, Rol *et al.*, 2011).

Após avaliar a produção de sIgA após infecção oral por *Brucella abortus*, foi observado que os animais WT infectados apresentaram aumento da secreção de sIgA, em relação aos WT não infectados (**Figura 23**). Por outro lado, os animais Nlrp6^{-/-} não alteraram a quantidade secretada dessa imunoglobulina frente à infecção, comparados aos Nlrp6^{-/-} não infectados. De maneira interessante, foi observado que os animais deficientes para NLRP6 secretaram uma maior quantidade de sIgA em relação aos animais WT quando ambos não estavam infectados.

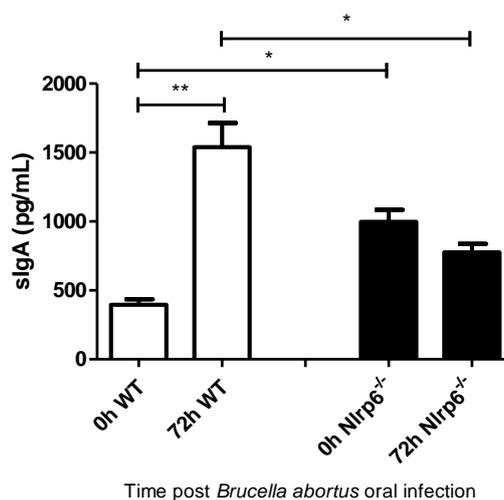


Figura 23 – Dosagem de sIgA em animais WT versus Nlrp6^{-/-} após infecção oral por *B. abortus*. Animais WT e Nlrp6^{-/-} foram infectados, por via oral, com 1x10⁹ UFC de *B. abortus*. Após 0 (não infectados) e 72 horas de infecção, foi coletado o conteúdo do intestino delgado para processamento e dosagem da Imunoglobulina A secretada. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05; **p < 0,01

Foi realizada, também, a dosagem de sIgA do fluido intestinal dos animais de ambos os grupos submetidos ao experimento de transplante fecal da microbiota. Como resultado observamos que os animais *germ-free* que receberam a microbiota dos animais WT secretaram

uma menor quantidade de sIgA em relação aos animais GF que receberam a microbiota dos animais Nlrp6^{-/-} (**Figura 24**), semelhante ao fenótipo observado anteriormente para os animais convencionais (0h WT e 0h Nlrp6^{-/-}) (**Figura 23**).

Esses resultados sugerem que NLRP6 possa ter um papel regulador na produção/secreção de sIgA, principalmente via modulação da microbiota intestinal.

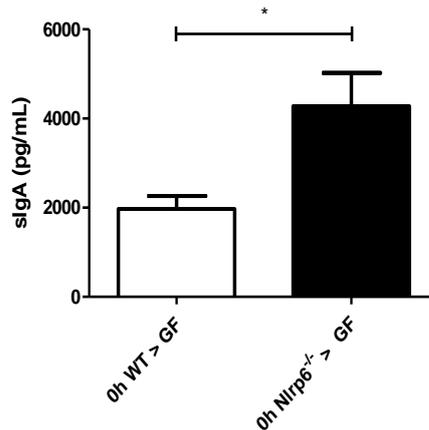


Figura 24 – Dosagem de sIgA em animais *germ-free* receptores da microbiota de camundongos WT e Nlrp6^{-/-}. Animais *germ-free* receberam por via oral as fezes de animais WT e Nlrp6^{-/-}. Após 72 horas de transplante, foi coletado o conteúdo do intestino delgado dos animais receptores para processamento e dosagem da Imunoglobulina A secretada. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). *p < 0,05.

Foi observado que a molécula NLRP6 parece ser importante principalmente no momento de invasão da bactéria através da mucosa intestinal. Qual seria seu papel no processo de infecção através de outro tipo de mucosa? Qual seria o fenótipo de susceptibilidade dos animais de ambos os grupos frente à infecção pulmonar por *Brucella abortus*?

5.13. Avaliação da susceptibilidade *in vivo* frente à infecção pulmonar por *B. abortus* em animais WT versus *Nlrp6*^{-/-}

Após infecção por *B. abortus* por via intratraqueal, foi observado, de forma interessante, que os animais deficientes para NLRP6 apresentaram menor carga bacteriana no lavado broncoalveolar em comparação aos animais WT (**Figura 25**), fenótipo este similar ao observado na infecção por via oral. Esse resultado fornece forte indício do papel de NLRP6 na resposta imune de mucosa frente a infecção por *B. abortus*.

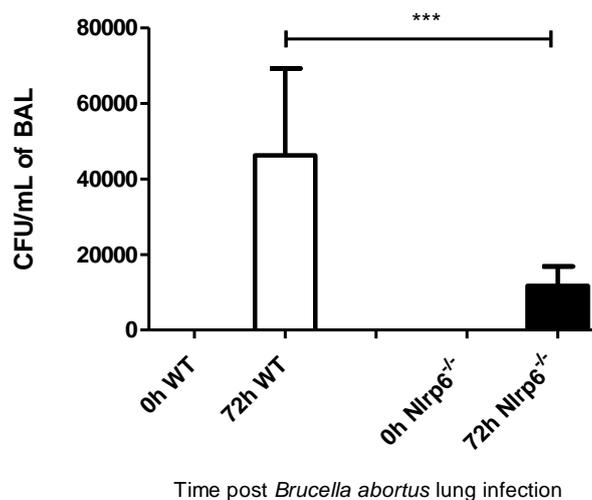


Figura 25 – Carga bacteriana no lavado broncoalveolar de animais WT versus *Nlrp6*^{-/-} após infecção pulmonar por *B. abortus*. Animais WT e *Nlrp6*^{-/-} foram infectados, por via intratraqueal, com 1×10^6 UFC de *B. abortus* e sacrificados após 0h (não infectados) e 72 horas de infecção. O LBA foi coletado e plaqueado para avaliação do título de bactérias viáveis através da contagem de UFC. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 – 7). ***p < 0,001.

6. DISCUSSÃO

Grande parte das infecções causadas por *Brucella* spp., tanto no homem quanto nos animais, são transmitidas pela via oral. Apesar de ser um local de presumível importância durante a invasão da bactéria, são poucos os estudos que abordam o trato gastrointestinal no contexto da brucelose (Pasquali, Rosanna *et al.*, 2003; Bandara, Contreras *et al.*, 2007; Delpino, Marchesini *et al.*, 2007; Sangari, Seoane *et al.*, 2007; Izadjoo, Mense *et al.*, 2008; Paixao, Roux *et al.*, 2009). Neste trabalho os principais achados foram: 1) a infecção por *Brucella abortus* induziu quebra da homeostase intestinal levando a disbiose da microbiota comensal e quebra da barreira epitelial, e 2) animais deficientes para NLRP6 foram mais resistentes à infecção por *B. abortus*, sugerindo que NLRP6 possa regular negativamente a infecção.

Apesar da *Brucella abortus* possuir diversos mecanismos estratégicos para evasão da resposta imune e posterior replicação (Sangari e Agüero, 1996; Hong, Tsolis *et al.*, 2000; Guzman-Verri, Manterola *et al.*, 2002; Ko e Splitter, 2003; Seleem, Boyle *et al.*, 2010), as células da imunidade inata do hospedeiro são equipadas com diversas moléculas que interagem direta ou indiretamente com a bactéria afim de controlar a infecção. Utilizando macrófagos e células dendríticas como modelo, receptores do tipo Toll como TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9 e os receptores NOD1 e NOD2, por exemplo, foram mostrados como responsáveis pelo reconhecimento da *B. abortus* (Macedo, Magnani *et al.*, 2008; Gomes, Campos *et al.*, 2012; Oliveira, Carvalho *et al.*, 2012; Gomes, Campos *et al.*, 2013; Gomes, Campos *et al.*, 2016). Inflamassomas como AIM2 e NLRP3 também foram revelados como sensores da *Brucella* levando a ativação de caspase-1 e resposta inflamatória que controla parcialmente a infecção (Marim, Franco *et al.*, 2017). O inflamassoma NLRP12, por sua vez, foi sugerido como importante na regulação negativa da resposta inflamatória inicial contra *B. abortus*, visto que camundongos *Nlrp12*^{-/-} foram mais resistentes nos tempos iniciais de infecção ao patógeno (Silveira, Gomes *et al.*, 2017).

Recentemente, diversos mecanismos da imunidade inata vêm demonstrando possuir papel importante na modulação da homeostase intestinal (Garrett, Gordon *et al.*, 2010; Maloy e Powrie, 2011; Renz, Brandtzaeg *et al.*, 2011). Nesse contexto, os inflamassomas manifestam-se como reguladores centrais do intestino, atuando em diversos cenários, dentre eles nas infecções, imunidade e inflamação (Rathinam e Chan, 2018). Como grande parte dos estudos focam no papel das células inflamatórias no processo de infecção por *Brucella* por via intraperitoneal, ainda não foram explorados os mecanismos que relacionam a brucelose à

receptores da imunidade inata em células da mucosa intestinal, por exemplo células epiteliais, as quais podem estar envolvidas no reconhecimento e processo de invasão da bactéria. Dentre os receptores da imunidade inata destacado como importante no processo de manutenção da barreira e homeostase intestinal, a molécula NLRP6 foi o alvo deste trabalho.

Primeiramente, visando a caracterização do modelo, observamos que a infecção por via oral por *B. abortus* foi eficiente para o estabelecimento da infecção sistêmica e acometimento do trato gastrointestinal nos animais selvagens. Esses achados sugerem a participação da mucosa intestinal no processo de invasão por *Brucella*. Nossos resultados revelaram diversos achados referentes a alterações histopatológicas no intestino após a infecção por *B. abortus*, com alterações em todo comprimento do intestino delgado, e predomínio de comprometimento da arquitetura duodenal. Por outro lado, Paixão e colaboradores (2009) ao caracterizarem a infecção oral de *Brucella melitensis* (outra espécie de patógeno causador da brucelose, mas do mesmo gênero) não observaram alterações histopatológicas importantes no intestino dos animais infectados, mas, cabe ressaltar, que apenas cortes de íleo e cólon foram analisados pelo grupo além de que a espécie da bactéria e a linhagem de camundongos utilizados (BALB/c ByJ) foram diferentes.

Além disso, nossos achados demonstraram pela primeira vez que a infecção *in vivo* por *B. abortus* nos animais selvagens levou ao aumento da permeabilidade intestinal, o que sugere, portanto, a quebra de barreira epitelial como um dos mecanismos que facilitaria a entrada do patógeno. Outros trabalhos na literatura, utilizando modelo de infecção *ex vivo* na alça ileal do intestino, mostraram que a migração de *Brucella* através do epitélio intestinal ocorre a partir da sua endocitose pelo epitélio associado ao folículo (EAF) nas placas de Peyer ou por sua captação pelas células dendríticas penetrantes do EAF (Ackermann, Cheville *et al.*, 1988; Nakato, Hase *et al.*, 2012). Adicionalmente, Rossetti e colaboradores (2013) observaram, através de análises por *microarray*, que duas vias relacionadas a barreira epitelial intestinal (*Tight Junction* e *Trefoil Factors Initiated Mucosal Healing*) foram reprimidas durante a fase inicial de infecção por *Brucella*, sugerindo subversão da função de barreira e facilitação da migração transepitelial. Dessa forma, uma variedade de patógenos utiliza como mecanismo de invasão moléculas-alvo envolvidas na adesão celular como, por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori* a qual seu sistema de secreção do tipo 4 injeta um de seus efetores (CagA) na célula hospedeira modificando diversos processos e culminando na ruptura da barreira epitelial e na invasão da bactéria (Churin, Al-Ghoul *et al.*, 2003).

De maneira intrigante, observamos que a infecção por *Brucella* possibilitou a translocação de outras bactérias residentes da microbiota intestinal para órgãos sistêmicos como fígado e baço (dados não mostrados). Assim, é possível que a quebra de barreira tenha permitido a entrada de outras bactérias da microbiota através do epitélio intestinal, ainda que existam outros mecanismos pós-barreira, como as células imune residentes na submucosa, que funcionam como outra linha de defesa do hospedeiro. Esse é um mecanismo que merece estudo mais aprofundado e, portanto, não foi explorado neste trabalho.

Para explorarmos o papel de NLRP6 no intestino frente à infecção por *Brucella*, utilizamos animais *knockout* para essa molécula. Elinav e colaboradores (2011) já demonstraram que o inflamassoma NLRP6 no epitélio do cólon tem importante papel regulador da microbiota. Observaram que a deficiência para NLRP6 resulta em drásticas consequências na composição da comunidade microbiana, levando a disbiose, com expansão de grupos bacterianos potencialmente patogênicos. Além disso, como também visto em outros trabalhos, a deficiência para NLRP6 levou a redução da ativação de caspase-1 e IL-18, que são fundamentais para homeostase intestinal (Levy, Thaiss *et al.*, 2015; Nowarski, Jackson *et al.*, 2015).

Tendo como base os estudos anteriores e, relacionando todos os resultados que compõem este trabalho, sugerimos que a infecção pela *B. abortus* nos animais selvagens leva ao desequilíbrio da microbiota comensal. Esse desequilíbrio gera disbiose, com redução da diversidade bacteriana, principalmente de grupos tidos como benéficos para o hospedeiro, como Bacteroides, Bifidobactérias e Lactobacilos. Acreditamos que essa disbiose seja a principal responsável pela quebra de barreira epitelial observada nos animais WT que, conseqüentemente, permite maior passagem da *Brucella* para os órgãos sistêmicos. Assim, na ausência da microbiota, por sua depleção nos animais WT convencionais, a infecção não foi capaz de alterar a permeabilidade intestinal e uma redução da carga bacteriana sistêmica foi observada. Por outro lado, a infecção nos camundongos *Nlrp6^{-/-}* não acarretou em alteração de permeabilidade intestinal e os animais mostraram-se menos susceptíveis à infecção (em relação aos WT), sugerindo que a presença de NLRP6 está associada a manutenção da composição microbiana comensal e, conseqüentemente, na regulação da integridade epitelial e da carga bacteriana sistêmica.

Vale ressaltar que uma vez eliminada a microbiota “naturalmente” disbiótica dos animais *Nlrp6^{-/-}*, observamos que a infecção continuou não alterando a permeabilidade da barreira. Mas, de forma surpreendente, houve uma entrada expressiva de *Brucella* sistêmica,

sugerindo que a microbiota de animais *Nlrp6*^{-/-} é excepcionalmente importante para proteção desses camundongos contra o patógeno, e que, nesse grupo, a quebra de barreira epitelial parece não ser o fator primordial para invasão da *Brucella*. E mais ainda, uma vez que a ausência da microbiota associada a ausência da molécula NLRP6 permitiu a grande entrada da bactéria, isso é indicativo de que NLRP6 seja importante para o controle da sobrevivência de *B. abortus*.

Dessa forma, e considerando que os animais deficientes para NLRP6 já possuem “naturalmente” uma microbiota disbiótica, como sugerido por Elinav (2011), acreditamos que um outro mecanismo envolvido no controle da infecção seja a competição entre a microbiota de animais *Nlrp6*^{-/-} e *B. abortus* levando, por exemplo, a possível interação entre os microrganismos e produção de metabólitos capazes de eliminar o patógeno. De fato, muitas bactérias comensais inibem diretamente os patógenos competindo por nutrientes ou induzindo a produção de substâncias inibitórias, como são os casos de *Bacteroides thuringiensis* - capaz de secretar uma bacteriocina (*thuricin CD*) que age diretamente em Bacilli e Clostridia formadores de esporos, inclusive *C. difficile* (Rea, Sit *et al.*, 2010)-, e *Enterococcus faecium* e *Pediococcus pentosaceus* que produzem uma bacteriocina anti-*Listeria* (Pinto, Fernandes *et al.*, 2009; Chanos e Williams, 2011). Assim, apesar de não termos explorado esse mecanismo neste trabalho, dados da literatura nos permite sugerir que possa existir um mecanismo de competição da microbiota disbiótica de animais *Nlrp6*^{-/-} e seus patobiontes *versus B. abortus*.

Por outro lado, a microbiota e seus produtos são fatores relevantes para manutenção da integridade da barreira epitelial e homeostase intestinal. Um estudo mostrou que níveis combinatórios dos metabólitos modulados pela microbiota taurina, histamina e espermina foram identificados como reguladores da sinalização de NLRP6 na situação homeostática (Levy, Thaiss *et al.*, 2015). Um outro estudo mostrou que metabólitos produzidos pela microbiota comensal ativam receptores sensores de metabolismo altamente expressos em células epiteliais do intestino, como GPR43 e GPR109, que levam a ativação dos inflamassomas NLRP6 e NLRP3 culminando na secreção de IL-18 e, conseqüentemente, ao aumento da proliferação e regeneração das células epiteliais, mantendo a homeostase intestinal (Macia, Tan *et al.*, 2015). Desse modo, a disbiose e a quebra de barreira epitelial podem estar associadas ao desequilíbrio desses importantes fatores da homeostase intestinal.

Além disso, no cenário de disbiose, no qual existem alterações da microbiota comensal e, portanto, também em seu balanço metabólico, a regulação de NLRP6 é alterada, bem como a secreção de IL-18 e peptídeos antimicrobianos, o que facilita a perpetuação de uma colonização microbiana aberrante (Levy, Thaiss *et al.*, 2015). Outra característica notável da

microbiota disbiótica de camundongos deficientes em NLRP6 é sua capacidade de transferir e estabelecer em camundongos do tipo selvagem (Elinav, Strowig *et al.*, 2011; Elinav, Thaiss *et al.*, 2013). Observamos que ao transferir a microbiota dos animais de ambos os grupos, que tiveram contato prévio com *B. abortus*, para animais *germ-free*, esses estabeleceram o fenótipo de permeabilidade semelhante ao do respectivo grupo doador. Isso nos fez acreditar que o contato entre a *Brucella* e a microbiota foi capaz de gerar alterações no seu metabolismo, que passou a produzir níveis diferentes de metabólitos reguladores da sinalização local. E essa “informação” pôde ser, então, transferida para o animal receptor. A “transmissão de fenótipo” através do transplante da microbiota também foi observada no trabalho de Elinav e colaboradores (2011), no qual mostraram que a microbiota de camundongos *Nlrp6*^{-/-} “transmitiu” o fenótipo de susceptibilidade à colite para camundongos selvagens.

Quando as células de defesa do trato gastrointestinal falham na captura de microrganismos ou seus metabólitos translocados, esses são, então, drenados principalmente pela veia porta para o fígado (Brenchley e Douek, 2012). Consoante a isso, estudos anteriores mostraram que maiores concentrações de LPS são detectadas na veia porta quando comparada a outras veias hepáticas ou periféricas e, de forma interessante, bactérias podem ser cultivadas mesmo a partir de explantes de fígados saudáveis (Lumsden, Henderson *et al.*, 1988; Singh, Bullard *et al.*, 2011). O fenótipo de resistência exibido pelos camundongos deficientes para NLRP6, comparado aos WT, foi observado somente no fígado. O que poderia sugerir uma regulação da sobrevivência de *Brucella* por esse órgão. Mas, ao realizarmos a infecção intraperitoneal, constatamos que esse fenótipo foi perdido. Considerando que a veia porta seja a principal rota de entrada sistêmica da *Brucella* vinda do intestino, acreditamos que o fígado possa refletir o resultado da resposta intestinal à infecção. Assim, sugerimos que NLRP6 tenha um papel crucial principalmente no momento de invasão/entrada da bactéria através da mucosa intestinal.

Adicionalmente, estudos em humanos e camundongos localizaram a alta expressão de NLRP6 nas células epiteliais intestinais, principalmente enterócitos (Elinav, Strowig *et al.*, 2011; Gremel, Wanders *et al.*, 2015) e células caliciformes (Wlodarska, Thaiss *et al.*, 2014). Até o presente momento não existem trabalhos na literatura demonstrando a capacidade da *B. abortus* infectar *in vivo* células epiteliais do intestino em modelo murino. Neste trabalho, através de dados preliminares, observamos que o patógeno foi capaz de infectar esse tipo celular, o que sugere a célula epitelial intestinal como uma das portas de entrada da *B. abortus* através da mucosa intestinal. E, de maneira interessante, observamos que o fenótipo de

susceptibilidade entre os grupos foi fielmente reproduzido, visto que as células epiteliais dos animais WT foram mais susceptíveis a infecção por *B. abortus* em relação as de *Nlrp6*^{-/-}, sugerindo o papel determinante de NLRP6 nesse tipo celular que se localiza na intrigante interface hospedeiro-microbiota.

Por outra perspectiva, Anand e colaboradores (2012) observaram que animais deficientes para NLRP6 foram mais resistentes à infecção por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimutium* e *Escherichia coli*, apresentando aumento no número de monócitos e neutrófilos circulantes além de aumento da produção celular de citocinas e quimiocinas dependentes de NF-κB e MAPK. Sugeriram, então, NLRP6 como um regulador negativo da sinalização inflamatória. Além disso, existem relatos clínicos na literatura evidenciando inflamação gastrointestinal causada por *Brucella* em humanos provocando, por exemplo, colite e ileíte (Petrella e Young, 1988; Jorens, Michielsen *et al.*, 1991; Potasman, Even *et al.*, 1991; Stermer, Levy *et al.*, 1991), sugerindo um processo inflamatório gastrointestinal participando da infecção.

De forma interessante, demonstramos pela primeira vez em modelo murino que a infecção por *B. abortus* leva ao aumento de eosinófilos no intestino. Esse achado corrobora com raros relatos da literatura médica que apresentam a eosinofilia como manifestação clínica em pacientes com brucelose (Elsom, 1942; Jiao, Chu *et al.*, 2015). Eosinófilos podem atuar como células efetoras liberando grânulos tóxicos e armadilhas de DNA mitocondrial diretamente no patógeno, mas, também, tem papel importante nas respostas imunes específicas à antígenos do trato gastrointestinal (TGI) agindo como célula apresentadora de antígeno ou mesmo potencializando a inflamação através da liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que podem modular o sistema de adesão do TGI, o tráfico de leucócitos, a remodelação tecidual e os estados de ativação celular (Hogan, Waddell *et al.*, 2013). De forma interessante um estudo mostrou que a diminuição da degranulação de eosinófilos na presença de elevado número dessa célula sugere que os eosinófilos podem desempenhar um papel na remodelação/reparo do epitélio lesionado (Lampinen, Ronnblom *et al.*, 2005). Outros estudos indicam que eosinófilos podem fagocitar e matar bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Yazdanbakhsh, Eckmann *et al.*, 1986). Os animais deficientes para NLRP6 também mostraram aumento de eosinófilos intestinais observado pelo dado do ensaio de EPO, bem como exibiram aumento de leucócitos circulantes em relação aos animais selvagens. Sugerindo que esses fatores podem estar associados ao fenótipo de resistência

exibido por esses animais, e sugerem também NLRP6 como um regulador negativo da resposta inflamatória, corroborando com achados de Anand e colaboradores (2012).

O muco intestinal é a primeira camada de defesa contra invasão de patógenos e protege o epitélio contra danos físicos. Ele compreende uma camada externa de muco mais desestruturada que contém a microbiota, e uma interna, firmemente aderida ao epitélio e densamente repleta de mucinas secretadas e transmembranares, desprovida, portanto, de bactérias (Johansson, Phillipson *et al.*, 2008; Gill, Wlodarska *et al.*, 2011). Curiosamente, NLRP6 parece ter um papel importante na manutenção de uma barreira epitelial dependente de muco, uma vez que camundongos *Nlrp6*^{-/-} mostraram disfunção na exocitose de grânulos de muco por células caliciformes (Wlodarska, Thaiss *et al.*, 2014).

Neste trabalho observamos que animais WT infectados exibiram redução da expressão de MUC1, uma mucina de superfície celular que é sugerida como moduladora do balanço crítico entre o crescimento celular - interagindo com receptores de fatores de crescimento para manter a função de barreira - (Schroeder, Thompson *et al.*, 2001) e a apoptose - ativando vias antiapoptóticas, para modular o processo de descarte de células epiteliais infectadas da mucosa - (Raina, Kharbanda *et al.*, 2004; Ren, Agata *et al.*, 2004). Uma vez que as células epiteliais dos animais WT foram as mais susceptíveis a infecção por *B. abortus*, acreditamos que a expressão diminuída de MUC1 poderia auxiliar no sistema de descarte dessas células infectadas. Além disso, corroborando com a hipótese de que a disbiose seja o principal fator que auxilia na entrada de *B. abortus* através do intestino dos animais WT, trabalhos na literatura mostram que a microbiota comensal tem papel regulador da produção de mucinas intestinais e que, no estado de disbiose, ocorre um aumento de até 100 vezes na quantidade de bactérias mucolíticas (que tem habilidade de degradar mucinas) da microbiota comprometendo a função de barreira do epitélio intestinal e, conseqüentemente, aumentando o potencial de invasão de microrganismos (McCabe e Parameswaran, 2017).

Por outro lado, a infecção por *Brucella* nos animais deficientes para NLRP6 não causou alteração nos níveis de expressão dos transcritos de mucina, o que pode estar relacionado com a permeabilidade intestinal que se manteve inalterada após a infecção nesses animais. Além disso, observamos que os animais *Nlrp6*^{-/-} não infectados expressaram uma quantidade menor dos dois transcritos de mucina, em relação aos selvagens, sugerindo que possivelmente sua “disbiose natural” gere um fenótipo de redução da camada de muco, o que é reforçado por outros estudos (Wlodarska, Thaiss *et al.*, 2014), e que o muco pode não ser um mecanismo de defesa tão primordial para esse grupo.

Outro mediador inflamatório importante na homeostase intestinal é a citocina IL-18, a qual sua indução intestinal pela microbiota é dependente do inflamassoma NLRP6. Essa citocina tem papel indispensável no controle da homeostase, principalmente através da promoção da regeneração epitelial e ativação de peptídeos antimicrobianos (Levy, Thaiss *et al.*, 2015). Observamos que após a infecção por *Brucella*, os animais WT aumentaram a expressão de IL-18 enquanto os Nlrp6^{-/-} reduziram, o que pode sugerir o papel de NLRP6 também no controle transcricional dessa molécula. Cabe destacar, no entanto, que apesar de se tratar de um dado interessante, não avaliamos a secreção da proteína IL-18 que é, por sua vez, um processo controlado pela ativação de inflamassoma (Kempster, Belteki *et al.*, 2011). De forma intrigante não observamos alterações significativas na produção de outras citocinas importantes no processo de inflamação intestinal investigado e os animais responderam de forma heterogênea dentro dos grupos, dado esse que, também, já foi observado em outros trabalhos na literatura (Barquero-Calvo, Chaves-Olarte *et al.*, 2007; Paixao, Roux *et al.*, 2009; Ferrero, Fossati *et al.*, 2012). Isso sugere que a infecção oral por *B. abortus* é silenciosa induzindo uma resposta inflamatória branda no intestino, um órgão que já é naturalmente inflamado, o que pode facilitar o estabelecimento da infecção sistêmica.

Anfirregulina, outro mediador importante na regulação das respostas inflamatórias intestinais, é um membro da família dos fatores de crescimento epidérmico (EGF). É sugerida como crítica para regeneração epitelial intestinal após lesão (Shao e Sheng, 2010) e possui papel controverso na proliferação celular (Shoyab, McDonald *et al.*, 1988). Observamos que os animais selvagens aumentaram a expressão do transcrito dessa molécula após infecção por *Brucella*, o que não ocorreu nos animais Nlrp6^{-/-}. Isso pode sugerir tanto um papel de NLRP6 na regulação transcricional de Anfirregulina ou, por outro lado, uma vez que houve quebra de barreira epitelial apenas nos animais WT, sua expressão pode ter sido aumentada afim de reparar o dano epitelial.

Como outro fator importante para a defesa da mucosa, investigamos também a secreção do anticorpo sIgA. A sIgA realiza classicamente o processo de exclusão imune promovendo o *clearance* de antígenos e microrganismos patogênicos do lúmen intestinal, prendendo-os na camada de muco e facilitando sua remoção por atividades peristálticas e mucociliares. De forma interessante, observamos que após a infecção apenas os animais WT tiveram aumento de sIgA, sugerindo que NLRP6 possa ter um papel regulador na produção/secreção dessa molécula, ou que sua produção foi aumentada devido a alteração da permeabilidade intestinal que vimos ser gerada pela infecção exclusivamente nos animais selvagens. Observamos também que, sem a

infecção, os animais deficientes para NLRP6 apresentam naturalmente uma maior quantidade de sIgA no fluido intestinal em relação aos WT. Isso reforça a premissa de que os animais *Nlrp6^{-/-}*, em condições normais, possuem uma microbiota disbiótica e a produção aumentada de sIgA poderia ser regulada por essa diferente composição microbiana. O nível aumentado de IgA no soro de animais deficientes para NLRP6 foi observado por Elinav e colaboradores (2011).

Reforçando ainda mais o papel de NLRP6 atrelado a resposta imune de mucosa, observamos que, no modelo de infecção pulmonar, os camundongos *Nlrp6^{-/-}* também apresentaram o fenótipo de resistência a infecção por *B. abortus*. O papel importante e específico desse NLR na mediação da defesa da mucosa intestinal do hospedeiro também foi observado em outros trabalhos. Um deles mostra que a expressão de NLRP6 pode ser induzida por infecção viral, assim, camundongos deficientes para a molécula são mais susceptíveis à infecção entérica por vírus de RNA, como o vírus da encefalomiocardite e o norovirus murino. Apesar disso, a mortalidade após a infecção sistêmica por esses vírus não é afetada pela ausência de NLRP6, o que destaca, novamente, seu papel específico na defesa da mucosa intestinal (Wang, Zhu *et al.*, 2015). Como curiosidade, existem relatos na literatura que sugerem, também, uma compartimentalização da resposta a *Brucella*. Pasquali e colaboradores (2003), nesse sentido, estudaram o efeito da vacinação oral com *Brucella abortus* RB51 (cepa vacinal mutante de *B. abortus* S2308 deficiente para o antígeno O do LPS) em camundongos desafiados por via oral ou por via intraperitoneal com *B. abortus* S2308. De forma interessante, observaram que os animais vacinados oralmente ficaram protegidos contra o desafio oral, mas não contra o desafio intraperitoneal. Segundo os autores, esses resultados fornecem forte evidência de que quando a brucelose é adquirida por via oral, a resposta imune é compartimentalizada como uma resposta de mucosa que não está necessariamente conectada à resposta imune sistêmica.

Em suma, os trabalhos na literatura revelam que NLRP6 possui uma notável gama de funções, altamente distintas, de maneira específica para cada tipo celular e contexto em que está inserido. Isso é facilmente observado nos dados obtidos nesse trabalho, nos quais o contexto em que NLRP6 está ou não inserido altera diretamente o resultado da resposta do hospedeiro frente à infecção por *B. abortus*. Portanto, entendemos que como um possível alvo terapêutico NLRP6 não deve ser visto como um mecanismo isolado, já que a microbiota do hospedeiro parece ser importante assim como seu papel na barreira epitelial. Dessa forma, uma interessante

estratégia terapêutica futura consistiria em mecanismos que realizassem a inibição da atividade de NLRP6 juntamente com a regulação da microbiota comensal.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a infecção oral por *Brucella abortus* altera a homeostase intestinal em favor do estabelecimento de infecção sistêmica, e um dos mecanismos envolvidos nesse processo é dependente da molécula NLRP6. O NLRP6 mostrou-se importante no controle da sobrevivência da bactéria, na manutenção da barreira epitelial e na regulação negativa da resposta imune frente à infecção por via oral pela *B. abortus*, na qual a microbiota intestinal parece exercer um papel determinante.

8. MODELO

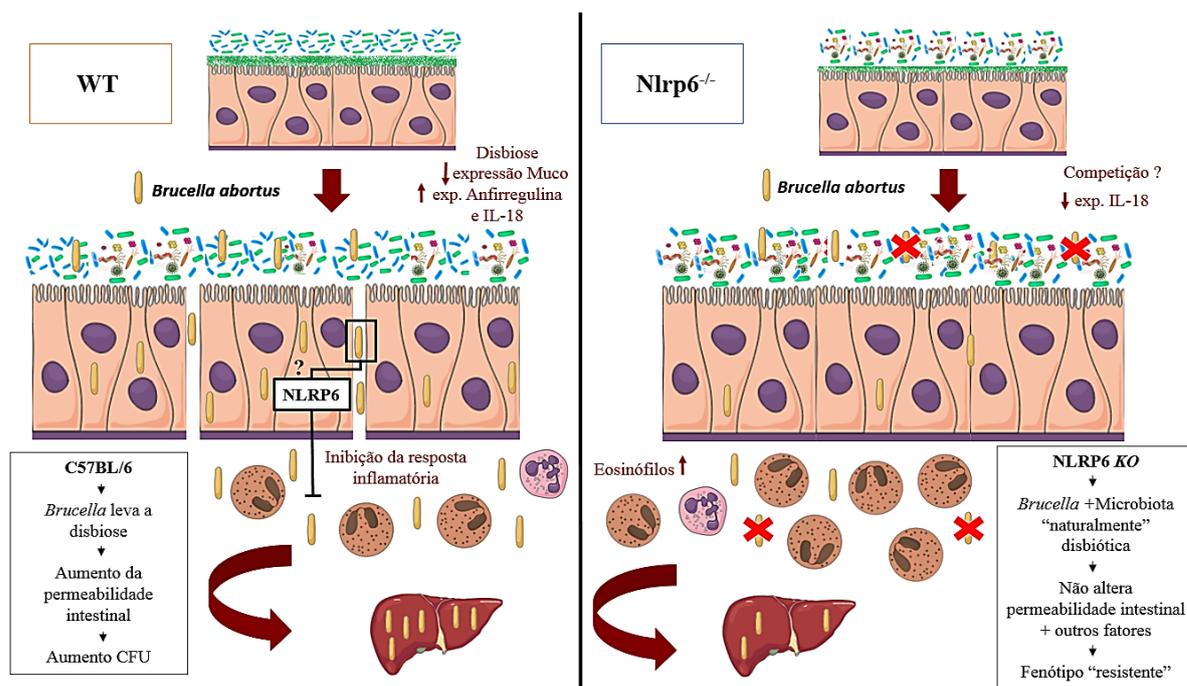


Figura 26 – Modelo da resposta à infecção oral por *B. abortus* em animais WT versus *Nlrp6*^{-/-}. Como panorama geral, acreditamos que a infecção por *Brucella abortus* em animais WT (à esquerda) leva a disbiose da microbiota comensal com consequente aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo a invasão do patógeno. Essa disbiose pode levar ao aumento de bactérias mucolíticas, reduzindo a espessura da camada protetora de muco além de aumentar a expressão de transcritos de moléculas relacionadas ao reparo e proliferação de células epiteliais. Além disso, sugerimos que a presença de NLRP6 possa inibir a resposta inflamatória culminando no estabelecimento da infecção sistêmica observado pela presença de *B. abortus* no fígado dos animais. Quanto aos animais deficientes para NLRP6 (à direita) acreditamos que sua microbiota "naturalmente" disbiótica seja capaz de competir com *Brucella* spp. e que uma menor quantidade da bactéria consiga atravessar a barreira epitelial que, por sua vez, não sofre alteração da permeabilidade. A ausência de NLRP6 permite o aumento da resposta inflamatória celular, com predomínio de eosinófilos, que culmina na redução da carga bacteriana observada no fígado desses animais.

9. REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. R.; CHEVILLE, N. F.; DEYOE, B. L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. **Vet Pathol**, v. 25, n. 1, p. 28-35, Jan 1988.
- AGRICULTURA, M. D. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasil 2006.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 24 2006.
- ANAND, P. K. et al. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 389-93, Aug 16 2012.
- ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 6, p. 411-20, Jun 2008.
- BANDARA, A. B. et al. *Brucella suis* urease encoded by ure1 but not ure2 is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 57, Jun 19 2007.
- BARBER, G. N. STING: infection, inflammation and cancer. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 12, p. 760-70, Dec 2015.
- BARQUERO-CALVO, E. et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. **PLoS One**, v. 2, n. 7, p. e631, Jul 18 2007.
- BOSCHIROLI, M. L. et al. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 3, p. 1544-9, Feb 5 2002.
- BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. Microbial translocation across the GI tract. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 149-73, 2012.
- BRUCE, D. **Note on the discovery of a micro-organism in malta fever**. 1887.
- CAMPOS, M. A. et al. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 176-86, Jan 2004.
- CANESSO, M. C. C. et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. **Mucosal Immunol**, Dec 20 2017.
- CARVALHO NETA, A. V. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. **Vet J**, v. 184, n. 2, p. 146-55, May 2010.
- CELLI, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. **Res Microbiol**, v. 157, n. 2, p. 93-8, Mar 2006.

- CELLI, J. et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. **J Exp Med**, v. 198, n. 4, p. 545-56, Aug 18 2003.
- CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 10, p. 735-44, Oct 2010.
- CHANOS, P.; WILLIAMS, D. R. Anti-Listeria bacteriocin-producing bacteria from raw ewe's milk in northern Greece. **J Appl Microbiol**, v. 110, n. 3, p. 757-68, Mar 2011.
- CHEN, G. Y. Role of Nlrp6 and Nlrp12 in the maintenance of intestinal homeostasis. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 2, p. 321-7, Feb 2014.
- CHEN, G. Y. et al. A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. **J Immunol**, v. 186, n. 12, p. 7187-94, Jun 15 2011.
- CHURIN, Y. et al. Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. **J Cell Biol**, v. 161, n. 2, p. 249-55, Apr 28 2003.
- COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, n. 6, p. 499-507, Jun 1998.
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 2, p. 213-21, Apr-Jun 1997.
- CORBEL, M. J.; MORGAN, W. J. B. Genus *Brucella* Meyer and Shaw. In: HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology** Baltimore: Williams and Wilkins, v.1, 1984. p.377-388.
- DE JONG, M. F.; SUN, Y. H.; DEN HARTIGH, A. B. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophage by the *Brucella* type IV secretion system. **Molecular Microbiology**, v. 70, p. 1378-1396, 2008.
- DELPINO, M. V. et al. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. **Infect Immun**, v. 75, n. 1, p. 299-305, Jan 2007.
- DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11-22, Jan 2004.
- DUERR, C. U.; HORNEF, M. W. The mammalian intestinal epithelium as integral player in the establishment and maintenance of host-microbial homeostasis. **Semin Immunol**, v. 24, n. 1, p. 25-35, Feb 2012.
- ELINAV, E.; HENAO-MEJIA, J.; FLAVELL, R. A. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 1, p. 4-13, Jan 2013.
- ELINAV, E. et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 745-57, May 27 2011.

ELINAV, E.; THAISS, C. A.; FLAVELL, R. A. Analysis of microbiota alterations in inflammasome-deficient mice. **Methods Mol Biol**, v. 1040, p. 185-94, 2013.

ELSOM, K. I., F. Eosinophilia and Pneumonitis in chronic brucellosis; a report of two cases. **Ann Intern Med**, v. 16, n. 5, p. 995-1002, 1942.

FERRERO, M. C. et al. *Brucella* invasion of human intestinal epithelial cells elicits a weak proinflammatory response but a significant CCL20 secretion. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 45-57, Oct 2012.

GARRETT, W. S.; GORDON, J. I.; GLIMCHER, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 859-70, Mar 19 2010.

GILL, N.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection. **Cell Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 660-9, May 2011.

GOMES, M. T. et al. The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 130, 2012.

GOMES, M. T. et al. Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. **J Immunol**, v. 190, n. 7, p. 3629-38, Apr 1 2013.

GOMES, M. T. et al. TLR9 is required for MAPK/NF-kappaB activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. **J Leukoc Biol**, v. 99, n. 5, p. 771-80, May 2016.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 281-97, Dec 20 2002.

GRACZ, A. D.; PUTHOFF, B. J.; MAGNESS, S. T. Identification, isolation, and culture of intestinal epithelial stem cells from murine intestine. **Methods Mol Biol**, v. 879, p. 89-107, 2012.

GREMEL, G. et al. The human gastrointestinal tract-specific transcriptome and proteome as defined by RNA sequencing and antibody-based profiling. **J Gastroenterol**, v. 50, n. 1, p. 46-57, Jan 2015.

GRENIER, J. M. et al. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. **FEBS Lett**, v. 530, n. 1-3, p. 73-8, Oct 23 2002.

GRILLÓ, M. J. et al. What have we learned from brucellosis in the mouse model? . **Vet. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 1-35, 2012.

GUZMAN-VERRI, C. et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 19, p. 12375-80, Sep 17 2002.

- HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasomes and metabolic disease. **Annu Rev Physiol**, v. 76, p. 57-78, 2014.
- HILL, D. A.; ARTIS, D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 623-67, 2010.
- HOGAN, S. P.; WADDELL, A.; FULKERSON, P. C. Eosinophils in infection and intestinal immunity. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 29, n. 1, p. 7-14, Jan 2013.
- HONG, P. C.; TSOLIS, R. M.; FICHT, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4102-7, Jul 2000.
- HU, S. et al. The DNA Sensor AIM2 Maintains Intestinal Homeostasis via Regulation of Epithelial Antimicrobial Host Defense. **Cell Rep**, v. 13, n. 9, p. 1922-36, Dec 1 2015.
- HUANG, L. Y. et al. Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. **J Immunol**, v. 171, n. 3, p. 1441-6, Aug 1 2003.
- HUANG, L. Y. et al. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. **J Immunol**, v. 175, n. 6, p. 3964-70, Sep 15 2005.
- HUNT, A. C.; BOTHWELL, P. W. Histological findings in human brucellosis. **J Clin Pathol**, v. 20, n. 3, p. 267-72, May 1967.
- INOHARA, N.; NUNEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 371-82, May 2003.
- IZADJOO, M. J. et al. A study on the use of male animal models for developing a live vaccine for brucellosis. **Transbound Emerg Dis**, v. 55, n. 3-4, p. 145-51, May 2008.
- JIAO, P. F. et al. Expression of eosinophils be beneficial to early clinical diagnosis of brucellosis. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 10, p. 19491-5, 2015.
- JOHANSSON, M. E. et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 39, p. 15064-9, Sep 30 2008.
- JORENS, P. G. et al. A rare cause of colitis--*Brucella melitensis*. Report of a case. **Dis Colon Rectum**, v. 34, n. 2, p. 194-6, Feb 1991.
- KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666-71, Oct 29 2015.
- KEMPSTER, S. L. et al. Developmental control of the Nlrp6 inflammasome and a substrate, IL-18, in mammalian intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 300, n. 2, p. G253-63, Feb 2011.
- KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 65-78, Jan 2003.

KOLE, A.; MALOY, K. J. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 380, p. 19-38, 2014.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 22 2014.

LAMPINEN, M. et al. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. **Gut**, v. 54, n. 12, p. 1714-20, Dec 2005.

LAPAQUE, N. et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Curr Opin Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 60-6, Feb 2005.

LAWINSKY, M. L. J. et al. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 75-84, 2010.

LEI-LESTON, A. C.; MURPHY, A. G.; MALOY, K. J. Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. **Front Immunol**, v. 8, p. 1168, 2017.

LEVY, M. et al. NLRP6: A Multifaceted Innate Immune Sensor. **Trends Immunol**, v. 38, n. 4, p. 248-260, Apr 2017.

LEVY, M. et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1428-43, Dec 3 2015.

LUMSDEN, A. B.; HENDERSON, J. M.; KUTNER, M. H. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. **Hepatology**, v. 8, n. 2, p. 232-6, Mar-Apr 1988.

LUPFER, C.; KANNEGANTI, T. D. The expanding role of NLRs in antiviral immunity. **Immunol Rev**, v. 255, n. 1, p. 13-24, Sep 2013.

MACEDO, G. C. et al. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **J Immunol**, v. 180, n. 2, p. 1080-7, Jan 15 2008.

MACFIE, J. et al. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. **Br J Surg**, v. 93, n. 1, p. 87-93, Jan 2006.

MACIA, L. et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. **Nat Commun**, v. 6, p. 6734, Apr 1 2015.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298-306, Jun 15 2011.

MANTIS, N. J.; ROL, N.; CORTHESEY, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 6, p. 603-11, Nov 2011.

- MARIM, F. M. et al. The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during *Brucella abortus* infection. **Semin Immunopathol**, v. 39, n. 2, p. 215-223, Feb 2017.
- MARTIN, G. R.; WALLACE, J. L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 2, p. 130-7, Feb 2006.
- MARTIN, N. L.; HANCOCK, R. E. W. Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria. In: ADDAMS, G. (Ed.). **Advances in Brucellosis research**. College Station: Texas A and M-University Press, 1990. p.55-75.
- MAYNARD, C. L. et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231-41, Sep 13 2012.
- MCCABE, L. R.; PARAMESWARAN, N. **Understanding the Gut-Bone Signaling Axis: Mechanisms and Therapeutic Implications**. Springer International Publishing, 2017.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, Jul 24 1997.
- NAKATO, G. et al. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. **J Immunol**, v. 189, n. 4, p. 1540-4, Aug 15 2012.
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 5-9, Dec 20 2002.
- NICOLETTI, P. L. Relationship between animal and human disease. In: M.J, Y. E. J. C. (Ed.). **Brucellosis: Clinical and laboratory aspects**. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1989. p.41-51.
- NORMAND, S. et al. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 23, p. 9601-6, Jun 7 2011.
- NOWARSKI, R. et al. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1444-56, Dec 3 2015.
- NUNES, T.; DE SOUZA, H. S. Inflammasome in intestinal inflammation and cancer. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 654963, 2013.
- OLIVEIRA, F. S. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and -2 play no role in controlling *Brucella abortus* infection in mice. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 861426, 2012.
- OLIVEIRA, S. C. et al. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. **Microbes Infect**, v. 10, n. 9, p. 1005-9, Jul 2008.
- PAIXAO, T. A. et al. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4197-208, Oct 2009.

PAPPAS, G. et al. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 2, p. 91-9, Feb 2006.

PARANÁ, S. D. E. D. S. D. **Protocolo de manejo clínico e vigilância em saúde para brucelose humana no Estado do Paraná**. SAÚDE, S. D. V. E. Curitiba: 70 p. 2015.

PASQUALI, P. et al. *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain B. abortus 2308. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2326-30, May 2003.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141-53, Mar 2014.

PETRELLA, R.; YOUNG, E. J. Acute *Brucella* ileitis. **Am J Gastroenterol**, v. 83, n. 1, p. 80-2, Jan 1988.

PINTO, A. L. et al. Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. **Int J Food Microbiol**, v. 129, n. 1, p. 50-8, Jan 31 2009.

POESTER, F. P. **Manual de Zoonoses**. Curitiba: CRMV 2009.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Vet Microbiol** v. 90, n. 1-4, p. 55-62, 2002.

PORTE, F.; LIAUTARD; KOHLER, S. Early Acidification of Phagosomes Containing *Brucella suis* Is Essential for Intracellular Survival in Murine Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4041-4047, 1999.

POTASMAN, I. et al. Brucellosis: an unusual diagnosis for a seronegative patient with abscesses, osteomyelitis, and ulcerative colitis. **Rev Infect Dis**, v. 13, n. 6, p. 1039-42, Nov-Dec 1991.

RAINA, D.; KHARBANDA, S.; KUFÉ, D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 279, n. 20, p. 20607-12, May 14 2004.

RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 229-41, Jul 23 2004.

RANSON, N.; ERI, R. The Role of Inflammasomes in Intestinal Inflammation. **American Journal of Medical and Biological Research**, v. 1, n. 3, p. 64-76, 2013.

RATHINAM, V. A. K.; CHAN, F. K. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. **Trends Mol Med**, v. 24, n. 3, p. 304-318, Mar 2018.

- REA, M. C. et al. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 20, p. 9352-7, May 18 2010.
- REN, J. et al. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. **Cancer Cell**, v. 5, n. 2, p. 163-75, Feb 2004.
- RENZ, H.; BRANDTZAEG, P.; HORNEF, M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 1, p. 9-23, Dec 9 2011.
- ROOP, R. M., 2ND et al. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. **Med Microbiol Immunol**, v. 198, n. 4, p. 221-38, Nov 2009.
- ROSSETTI, C. A. et al. Systems biology analysis of *Brucella* infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81719, 2013.
- SANGARI, F. J.; AGUERO, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. **Microbiologia**, v. 12, n. 2, p. 207-18, Jun 1996.
- SANGARI, F. J. et al. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. **Infect Immun**, v. 75, n. 2, p. 774-80, Feb 2007.
- SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. Pt 4, p. 801-8, Apr 2010.
- SCHROEDER, J. A. et al. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. **J Biol Chem**, v. 276, n. 16, p. 13057-64, Apr 20 2001.
- SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 392-8, Jan 27 2010.
- SHAO, J.; SHENG, H. Amphiregulin promotes intestinal epithelial regeneration: roles of intestinal subepithelial myofibroblasts. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3728-37, Aug 2010.
- SHOYAB, M. et al. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 17, p. 6528-32, Sep 1988.
- SILVA, F. L.; PAIXAO, T. A.; BORGES, A. M. Brucelose Bovina. In: (Ed.). **Cad Tec Vet Zoot**, v.47, 2005. p.1-12.
- SILVEIRA, T. N. et al. NLRP12 negatively regulates proinflammatory cytokine production and host defense against *Brucella abortus*. **Eur J Immunol**, v. 47, n. 1, p. 51-59, Jan 2017.
- SINGH, R. et al. Status of bacterial colonization, Toll-like receptor expression and nuclear factor-kappa B activation in normal and diseased human livers. **Clin Immunol**, v. 138, n. 1, p. 41-9, Jan 2011.

- SOLERA, J. Update on brucellosis: therapeutic challenges. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S18-20, Nov 2010.
- STARR, T. et al. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. **Traffic**, v. 9, n. 5, p. 678-94, May 2008.
- STERMER, E. et al. Brucellosis as a cause of severe colitis. **Am J Gastroenterol**, v. 86, n. 7, p. 917-9, Jul 1991.
- SUN, Y. et al. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1478-87, 1487 e1-8, Jun 2013.
- SWANK, G. M.; DEITCH, E. A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. **World J Surg**, v. 20, n. 4, p. 411-7, May 1996.
- TAM, R.; SAIER JR, M. H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 320-346, 1993.
- TEKIN, I. O.; ORAL, H. B.; SHIRI-SVERDLOV, R. Mediators of gut mucosal immunity and inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 765303, 2015.
- THAISS, C. A. et al. Integration of Innate Immune Signaling. **Trends Immunol**, v. 37, n. 2, p. 84-101, Feb 2016.
- UGALDE, R. A. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. **Microbes Infect**, v. 1, n. 14, p. 1211-9, Dec 1999.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002.
- VIEIRA, A. T. et al. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **Am J Pathol**, v. 175, n. 6, p. 2382-91, Dec 2009.
- VIEIRA, A. T. et al. A Role for Gut Microbiota and the Metabolite-Sensing Receptor GPR43 in a Murine Model of Gout. **Arthritis Rheumatol**, v. 67, n. 6, p. 1646-56, Jun 2015.
- WALKER, R. L. **Brucella**. Microbiologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A: 185-191 p. 2003.
- WANG, P. et al. Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. **Science**, v. 350, n. 6262, p. 826-30, Nov 13 2015.
- WEISS, D. S. et al. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. **Infect Immun**, v. 73, n. 8, p. 5137-43, Aug 2005.

WERSHIL, B. K.; FURUTA, G. T. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 2 Suppl, p. S380-3; quiz S415, Feb 2008.

WHO. **Brucellosis in humans and animals**: World Health Organization: 1-102 p. 2006.

WLODARSKA, M. et al. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1045-59, Feb 27 2014.

WYATT, H. V. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 98, n. 10, p. 451-4, 2005.

YAN, Y. et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e6073, Jun 29 2009.

YANG, J.; ZHAO, Y.; SHAO, F. Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 32, p. 78-83, Feb 2015.

YAZDANBAKHSI, M. et al. Bactericidal action of eosinophils from normal human blood. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 192-8, Jul 1986.

YOUNG, E. J. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. **APMIS Suppl**, v. 3, p. 17-20, 1988.