

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Dalila Juliana Silva Ribeiro

O papel do sistema de secreção do tipo VI (TSS6) bacteriano na ativação dos inflamassomas durante a resposta imunológica inata

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília
Março, 2017



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Dalila Juliana Silva Ribeiro

O papel do sistema de secreção do tipo VI (T6SS) bacteriano na ativação dos inflamassomas durante a resposta imune inata

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília
Março, 2017

Dalila Juliana Silva Ribeiro

**O papel do sistema de secreção do tipo VI (T6SS) bacteriano na ativação
dos inflamassomas durante a resposta imune inata**

03 de março de 2017

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)
Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular- Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca (Membro titular)
Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular- Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges (Membro titular)
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina- Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Tatiana Amabile Campos (Membro suplente)
Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia- Universidade de Brasília

Dedico à memória da minha melhor amiga Paula, sua ausência é sentida diariamente, mas eu sei o quanto você ficaria feliz nesse momento. Você que sempre será a minha Per, até o fim.

Agradecimentos

A minha orientadora, Dra Kelly Grace Magalhães, por ter me dado a oportunidade e a honra de trabalhar e aprender com você todos esses anos. Você acreditou no meu potencial mesmo quando ainda era cedo e trabalhou para que eu sempre buscasse ser melhor. Por ter mostrado que é possível ser orientadora, amiga, conselheira e quase mãe em uma pessoa só. E acima de tudo, obrigada por não ter desistido de mim no momento mais difícil e sim ter me incentivado a continuar tentando.

Aos amigos e coautores desse trabalho, Rafael Côrrea e Raquel Almeida, por terem me acolhido desde o momento que eu cheguei ao laboratório e serem irmãos mais velhos em todos esses anos. Sem vocês eu não teria aprendido nem metade do que aprendi e esse trabalho não teria sido possível. Mas o maior agradecimento é pela amizade que me proporcionaram ao longo desses anos, apesar dos altos e baixos eu espero que a nossa jornada de conhecimento e crescimento ainda tenha muitos anos pela frente.

A família LIMI: Pasquinha, Tiago, Luís Côrrea, Gabriel Henrique (meu filhote), Igor, Victor, Heloísa, Gabriel Freire por todo o apoio diário e companheirismo. Em especial a Livia que há tantos anos me faz rir e quem o companheirismo e ajuda não se restringe aos assuntos do laboratório. Obrigada a todos por cada madrugada fazendo experimento, cada “in vivo”, lanches, risadas, churrascos, pela solidariedade prestada quando um experimento dá errado ou o “não marcado” insiste em ser marcado, por fazerem desse laboratório colorido uma segunda casa. Agradeço também a todos que já passaram pelo LIMI e de alguma forma contribuíram com o seu apoio, em especial ao amigo Luís Felipe e a Thaís e Cecília que com certeza foram fundamentais nessa jornada, me ensinaram muito e deixaram sua marca.

A professora Tatiana por todo apoio e todos os colegas do LAMP, em especial a Laura e Nayara as quais sempre ajudaram com muita disposição e boa vontade.

A todos os colegas e amigos de outros laboratórios: GPRO, LIA, LIPH e Biofísica, em especial a Clênia, Allan e Lara que sempre ajudaram seja de forma experimental, fazendo um café ou apenas jogando conversa fora.

A todos os professores da graduação em Biotecnologia que de alguma forma ajudaram na minha construção profissional, em especial aos professores Nádía Parachin, Márcia Mortari, José Raimundo Côrrea e Kelly Mulder que são verdadeiras inspirações nessa trajetória de amor a ciência.

Aos escoteiros do Bernardo Sayão por terem me acolhido e serem parte fundamental da minha vida, em especial a Tropa Escoteira Txucarramãe e os amigos Reys e Márcio.

Aos amigos que me proporcionaram momentos de alívio e descanso e que nos últimos meses me aguentaram falando sobre essa defesa diariamente: Raquel, Ícaro, Suellen, Biel, Aliny e Monique. A Camila, Alessa e Iracy, ter a companhia de vocês em todos esses anos de UnB com certeza fez toda a diferença. Cada aula, cada trabalho em grupo (não sei como nós sobrevivemos a isso ainda), cada almoço, dias de prova, reclamações da Alessa em aulas práticas, cantorias da Millis, todos esses momentos ficarão sempre eternizados. Ao Juan, por todos esses anos que marcaram e por ainda ser um grande amigo sempre a disposição e por sempre tentar me lembrar que tudo fica bem no final.

Ao meu melhor amigo Felipe, por me conhecer tão bem e saber exatamente como me fazer esquecer dos problemas.

A Bibi, por ser o maior presente que a UnB poderia me dar. Por deixar mais leve e ser esse apoio incondicional que tenta de todas as formas cuidar de mim. A Tia Mônica, Tio Gilberto e Laura por toda a paciência e carinho ao me receberem na sua casa todos esses anos.

A Maria Carolina, Vanessa Araújo e Vanessa Callai por serem aquelas amigas que são desde sempre e para sempre. Vocês que se dispuseram a ouvir o que precisasse, comemoravam comigo quando algum experimento dava certo ou sofriam quando dava errado. Por serem amigas excepcionais em todos os aspectos, vocês são um pedaço de mim.

A Ivy, por ter me carregado no colo e não me deixado desistir, por acreditar em mim mais do que eu mesma, por ser inspiração e me ensinar tanto, por todos esses anos e por tudo que você é e representa para mim.

A minha avó, Gessi, que mesmo sem compreender muito bem do que se trata sempre colocou esse mestrado em suas orações e fica feliz cada vez que eu conto algo relacionado a UnB. As minhas tias Cida e Lurdes e o meu tio Osvaldo. A minha tia Neuza e meu tio Poli, por todo cuidado, apoio e paciência, por sempre tentar me trazer de volta a realidade nos momentos de insegurança. A todos os familiares que me incentivam e estão orgulhosos desse momento.

A minha mãe, Maria das Dores Silva, minha maior razão de lutar para estar aqui hoje. Todo o seu suporte, cuidado, incentivo e amor incondicional nesses 23 anos tornaram esse momento possível e essa vitória é tão sua quanto minha.

Por sim, agradeço a Universidade de Brasília que se tornou meu lar em 2012, ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular, e as agências de fomento Capes, CNPq e FAPDF.

“It matters not what someone is born, but what they grow to be.”

Albus Dumbledore

Harry Potter e o Cálice de Fogo – JK Rowling

Sumário

Resumo.....	12
Absctract	13
Lista de abreviaturas, acrônimos, siglas e símbolos	14
Lista de Figuras.....	16
1.Introdução.....	18
1.1 <i>Escherichia coli</i>	18
1.2 Sistemas de secreção bacterianos	19
1.3 Sistema de secreção do tipo VI (SST6)	20
1.4 Resposta Imune contra infecção bacteriana.....	23
1.5 Inflamassoma	24
2.Objetivos	29
2.1 Objetivos Gerais	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3.Materiais e Métodos	30
3.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	30
3.2 Camundongos e considerações éticas	30
3.3 Macrófagos derivados de medula óssea.....	30
3.4 Condições de infecção <i>in vitro</i>	31
3.5 Pré tratamento com C75.....	31
3.6 Condições de infecção <i>in vivo</i>	31
3.7 Quantificação de células bacterianas viáveis em BMDM ou em camundongos infectados.....	32
3.8 Dosagem de citocinas.....	32
3.9 Dosagem de óxido nítrico.....	32
3.10 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	33
3.11 Análise da apresentação de antígenos lipídicos	33
3.12 Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos	33
3.13 Análises por Western Blot.....	34

3.14 Análise da ativação de caspase 1	34
3.15 Análise estatística.....	34
4.Resultados e Discussão	35
4.1 A secreção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela infecção com SEPT 362 é dependente do SST6.....	35
4.2 SEPT 362 modula a produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio.....	38
4.3 O SST6 atua durante a replicação intracelular de <i>E. coli</i> em macrófagos e influencia a capacidade de colonização do fígado e baço.....	40
4.4 SEPT 362 induz a secreção de IL-1 β de forma dependente de lcmF e ClpV em macrófagos.	43
4.5 Proteínas do SST6 participam da indução da auto proteólise de caspase 1 em macrófagos infectados com <i>E. coli</i>	45
4.6 A secreção de IL-1 β induzida por SEPT 362 é parcialmente dependente de caspase 1 e 11 e do receptor NLRP3 <i>in vitro</i>	47
4.7 SEPT 362 induz a clivagem de caspase 1 em camundongos infectados de forma parcialmente dependente de lcmF e independente de NLRP3.	48
4.8 Proteínas relacionadas à ativação do inflamassoma exercem diferentes papéis na capacidade microbiciada de macrófagos infectados com SEPT 362 bem como na colonização do baço e fígado de camundongos infectados.	49
4.9 A indução de NO bem como de ROS por SEPT 362 é alterada na ausência das caspases 1 e 11 e do receptor NLRP3.	54
4.10 O SST6 influencia a modulação da apresentação de antígenos lipídicos.....	56
4.11 Modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos por <i>E. coli</i> e os efeitos da inibição da ácido graxo sintase em macrófagos durante a infecção.	59
6.Conclusão	64

No trabalho apresentado mostramos que a presença de proteínas cruciais do SST6, ClpV e lcmF influenciam a capacidade de *E. coli* induzir uma resposta microbiciada mais exacerbada em macrófagos. Essas proteínas desenvolvem ainda um papel fundamental durante a replicação intracelular de *E. coli*. Apresentamos resultados que evidenciam a relação do SST6 com a ativação de vias relacionadas ao complexo do inflamassoma durante a infecção com *E. coli* SEPT 362. Nesse aspecto, a presença das caspases 1 e 11 e do receptor NLRP3 participam não só para a ativação do inflamassoma como também para o funcionamento de outros mecanismos celulares induzidos

durante a infecção. Por fim analisamos que a modulação da biogênese de CLs durante a infecção por *E. coli* tem influência de componentes do inflamassoma porém não é dependente do SST6 e a enzima ácido graxo sintase altera a replicação intracelular de *E. coli* também de forma dependente do inflamassoma. De forma conjunta esses resultados evidenciam a relação do SST6 como um mecanismo de patogenicidade capaz de influenciar a ativação do inflamassoma que acaba por interferir de vários aspectos da resposta imune inata. 64

7.Referências Bibliográficas 65

Resumo

Infecções por *Escherichia coli* (*E. coli*) ainda são um problema de saúde pública graças ao seu alto potencial zoonótico e ao fato de que em muitos países ainda existem altos índices de mortalidade. Sistemas de secreção são descritos como importantes aparatos celulares para que bactérias sejam capazes de translocarem proteínas efetoras para células hospedeiras. Dentre as proteínas efetoras que compõe o sistema de secreção do tipo VI (SST6), destacam-se ClpV e IcmF, por sua importância em manter o SST6 funcional. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar o papel do SST6 bacteriano, via ClpV e IcmF, na ativação dos inflamassomas durante a resposta imune inata. Através dos resultados observamos que o SST6 é crucial para a replicação intracelular de *E. coli* em macrófagos, modulando a secreção de citocinas, o metabolismo redox da célula e a ativação dos inflamassomas através da clivagem de caspase 1. As proteínas NLRP3 e as caspases 1 e 11 são necessárias para o aumento da secreção de IL-1 β induzida por *E. coli*. Demonstramos que a presença das caspases 1 e 11, bem como do receptor NLRP3 podem atuar em outros processos e mecanismos celulares ativados durante a infecção por *E. coli*, como a apresentação de antígenos lipídicos, geração de espécies reativas de oxigênios, produção de óxido nítrico e outras citocinas pró-inflamatórias. A ausência de componentes do inflamassoma favoreceu a replicação intracelular bacteriana assim como a colonização de órgãos vitais em camundongos como o fígado e o baço. Investigamos também o papel do metabolismo lipídico durante a infecção através da análise da biogênese de corpúsculos lipídicos e ainda constatamos que a replicação intracelular bacteriana está relacionada com a presença da enzima ácido graxo-sintase. Portanto o presente trabalho caracterizou os diferentes mecanismos celulares envolvidos durante a ativação da resposta imune inata frente à infecção com uma linhagem patogênica de *E. coli* focando no papel do sistema de secreção do tipo VI, através do uso de cepas onde suas proteínas efetoras são ausentes, e ainda a relevância de componentes do inflamassoma nesse processo.

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) infections remains a public health problem since its higher zoonotic power and the fact that in a lot of countries there are still cases with mortality risk. Secretion systems are described as important cellular apparatus to make bacteria capable of translocate effectors proteins to the host cell. Among all proteins constituent of type six secretion system (T6SS) effectors proteins, ClpV and IcmF are highlighted due to their importance to maintain T6SS functional. Therefore, the aim of the present work was to analyze the role of T6SS through ClpV and IcmF in inflammasome activation during innate immune response. Taken together, we demonstrated that T6SS is crucial to control intracellular bacterial replication in macrophages by modulating cytokines release, cell redox metabolism and inflammasome activation through caspase 1 cleavage. The NLRP3 receptor, as well as caspases 1 and 11, are necessary to increase IL-1 β release induced by *E. coli*. We showed that the presence of caspases 1 and 11 and NLRP3 can influence in other process and cellular mechanisms active during *E. coli* infection, such as, lipid antigen presentation, generation of oxygen reactive species, nitric oxide and other pro-inflammatory cytokines production. The absence of inflammasome components improved bacterial intracellular replication and the colonization of the liver and spleen in mice. We also investigated the role of lipid metabolism during infection through analyses of lipid droplet biogenesis and verified that intracellular bacterial replication can be associated with fatty acid synthase. Therefore, this work characterized the different mechanisms involved during innate immune response activation upon infection with a pathogenic strain of *E. coli* focusing in the role of bacterial T6SS, using strains where its effector proteins are absent, and the relevance of inflammasome components in this process.

Lista de abreviaturas, acrônimos, siglas e símbolos

Aim2: *Absent in Melanoma-2*

APEC: *E. coli* patôgenica de origem aviária

ASC: *Apoptosis-associated Speck-like protein*

BMDM: *Bone-marrow derived macrophage* (Macrófago derivado de medula óssea)

C75: *4-Methylene-2-octyl-5-oxotetrahydrofuran-3-carboxylic acid*

CARD: *Caspase activating and recruiting domain*

Casp: Caspase

CL: Corpúsculos lipídicos

CO₂: Dióxido de carbono

DAMPs: *Danger Associated Molecular Pattern*

DFCDA: *2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ExPEC: *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*

Fig: Figura

Hcp: *Hemolysin co-regulated protein*

IcmF: *Intracellular multiplication factor*

IL: Interleucina

IRFs: *Interferon regulatory factors*

Kg: Quilograma

LB: Luria-Bertani

LCCM: *L929 Cell Conditioned Medium* (meio condicionado de células L929)

LPS: Lipopolissacarídeo

Mg: Miligrama

MOI: *Multiplicity of Infection* (multiplicidade de infecção)

NF κ B: *Nuclear Factor Kappa B*

NLRC4: *NLR family, CARD domain-containing*

NLRP: *NLR family, Pyrin domain-containing*

NLR: *Nod-like Receptor*

NO: *Nitric oxide* (óxido nítrico)

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS: *Phosphate-Buffered Saline* (Salina Tamponada com Fosfato)

Pg: Picogramas

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

ROS: *Reactive oxygen species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDS-page: *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis*

SSTn: Sistema de Secreção Tipo III- IV ou VI

TLRs: *Toll-Like Receptor*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

UFC: Unidade formadora de colônias

VgrG: Proteínas G de repetições em valina e glicina

WT: Wild type

µg: micrograma

µL :microlitro

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura básica de sistemas de secreções em bactérias gram-negativas. Os sistemas do tipo II e V dependem das vias de secreção Sec ou Tat enquanto os sistemas I, III, VI e VI liberam seus substratos de forma independente. Fonte: GREEN e MECSAS, 2016.-----	20
Figura 2 - Montagem do SST6. Adaptado de: (BASLER, 2015).-----	22
Figura 3 – Modelo de ativação do inflamassoma. Fonte: (WALSH e colab., 2014).-----	25
Figura 4 – O papel da caspase 11 para ativação não canônica do inflamassoma e durante a indução de piroptose. Fonte: (BROZ, Petr e DIXIT, 2016).-----	26
Figura 5- Ativação do inflamassoma a partir de subunidades bacterianas. Fonte: (BROZ, Petr e DIXIT, 2016).-----	27
Figura 6 - O SST6 influencia na secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos infectados por <i>E. coli in vitro</i> e <i>in vivo</i> .-----	38
Figura 7 – Modulação dos níveis de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio a partir da infecção com SEPT 362, Δ ClpV e Δ IcmF.-----	40
Figura 8 - O papel do SST6 na replicação intracelular e colonização de órgãos -----	42
Figura 9 - O SST6 participa da indução de IL-1 β em macrófagos e camundongos infectados com <i>E. coli</i> .-----	44
Figura 10 – Infecção por SEPT 362 induz ativação e auto proteólise de caspase 1 em macrófagos.-----	46
Figura 11 – SEPT 362 induz a secreção de IL-1 β de forma dependente de caspases 1 e 11 e Nlrp3.-----	47
Figura 12 - Clivagem de caspase1 in vivo a partir de infecção com SEPT 362 -----	49
Figura 13 - O papel do inflamassoma NLRP3 e das caspases 1 e 11 durante a replicação intracelular de SEPT 362 e a colonização do fígado e baço.-----	52
Figura 14 - O papel do inflamassoma Nlrp3 e das caspases 1 e 11 na colonização do baço e fígado por SEPT 362 em diferentes tempos.-----	53
Figura 15 - Influência do inflamassoma na modulação do metabolismo redox por SEPT 362 -----	55
Figura 16 - Influência do SST6 na apresentação de antígenos lipídicos e secreção de IL-12 -----	59
Figura 17 - Papel do inflamassoma durante a biogênese de CL em macrófagos infectados com SEPT 362.-----	61

Figura 18 - Efeitos da inibição da ácido graxo sintase durante a biogênese de CL ao longo da infecção com *E. coli*----- 63

Figura 19 - Inibição da ácido graxo sintase altera a capacidade microbicida de macrófagos *Caspase 1-11 -/-* e *Nlrp3-/-*----- 63

1.Introdução

1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um bacilo gram-negativo que coloniza o trato gastro intestinal humano logo após o nascimento e passa a fazer parte da microbiota coexistindo de forma saudável e benéfica (RODRÍGUEZ e colab., 2015). Contudo, várias linhagens possuem atributos de virulência que conferem a capacidade de induzir uma diversidade de patologias tanto em humanos quanto em outros animais (CROXEN e FINLAY, 2010). Dentre as doenças tipicamente associadas à *E. coli* estão: infecções do trato gastrointestinal, infecções extra-intestinais: infecções do trato urinários, meningites e a sepse (KAPER, 2005).

As cepas de *E. coli* podem ser classificadas em diversas categorias, sendo o grupo responsável por infecções extra-intestinais conhecido como ExPEC (RUSSO e JOHNSON, 2000). Nas últimas décadas o número de fatalidades causadas por infecções com ExPEC aumentou tornando-se um enorme problema de saúde pública, além de estar envolvidas em grandes prejuízos na indústria de criação animal (MELLATA, 2013; PITOUT, 2012). O subgrupo APEC se encontra dentro do grupo ExPEC, e é constituído por bactérias de origem aviária. Entretanto, além do potencial zoonótico, já foi demonstrado a capacidade de cepas APEC de infectarem células de mamíferos e ainda induzir meningite (TIVENDALE e colab., 2010), assim como a apoptose em macrófagos (BASTIANI e colab., 2005).

Cepas patogênicas de *E. coli* utilizam diversos mecanismos que as tornam capazes de colonizar, invadir e lesar os tecidos do hospedeiro. A adesão à célula hospedeira é essencial, seguida de uma subversão dos processos celulares assim como uma evasão da resposta imune (BHAVSAR e colab., 2007). Para isso, cepas de *E. coli* utilizam estruturas como fímbrias e pílus e secretam várias proteínas e toxinas (CROXEN e FINLAY, 2010). Essa secreção de fatores de virulência usualmente ocorre através de nanoaparatos moleculares altamente especializados conhecidos como sistemas de secreção (COSTA e colab., 2015).

1.2 Sistemas de secreção bacterianos

As bactérias necessitam transportar diversos substratos de seu interior para outros compartimentos, seja para o meio extracelular seja diretamente para o interior de outra célula procariota ou eucariota, e para isso os sistemas de secreção são essenciais (GREEN e MECSAS, 2016). Os sistemas de secreção são os principais meios desenvolvidos para o transporte de proteínas efetoras, fatores de virulências e ácidos nucleicos para além das membranas fosfolipídicas de células hospedeiras. Esses aparatos podem modular relações intracelulares e estão associados com a patogenicidade e capacidade de adesão do microorganismo, interação com o meio extracelular, adaptação e sobrevivência (COSTA e colab., 2015). Em virtude da especificidade de expressão associada ao sistema de secreção de algumas bactérias patogênicas, o uso desses sistemas como alvo de antibióticos passou a ser alvo de estudos (GREEN e MECSAS, 2016).

Há uma variedade de classes de sistemas de secreção e alguns podem ser encontrados em uma boa parte das bactérias que secretam uma diversidade de substratos. Entretanto, existem alguns sistemas que estão presentes em um menor número de bactérias ou que secretam exclusivamente apenas algumas proteínas específicas. Atualmente existem 7 tipos de sistemas de secreção descritos, tipo I ao tipo VII (COSTA e colab., 2015).

Estruturalmente os sistemas de secreção podem ser diferenciados baseado-se no fato de seus substratos necessitam de atravessar uma, duas ou até três membranas, sendo duas primeiras as membranas internas e externas bacterianas e a terceira a membrana da célula hospedeira (RÊGO e colab., 2010). Todos os sistemas de secreção compartilham o fato de parte de sua estrutura possuir um canal de barril- β formando uma espécie de cilindro na membrana externa bacteriana, entretanto há uma grande diversidade em suas outras estruturas e funções mecânicas (GREEN e MECSAS, 2016).

Em Gram negativas para que algumas proteínas consigam atravessar o espaço intramembranar e a membrana externa elas utilizam dois passos, primeiro são transportadas até o espaço periplasmático por meio das vias de secreção Sec ou Tat (NATALE e colab., 2008), e o segundo passo é o transporte via sistema de secreção através da membrana externa, os sistemas de secreção do tipo II e V participam desse processo. Já outros sistemas de secreção, tipo I, III, IV e VI,

liberam seus substratos de forma independente de Sec ou Tat pois seus canais atravessam a membrana interna e a membrana externa (Fig 1).

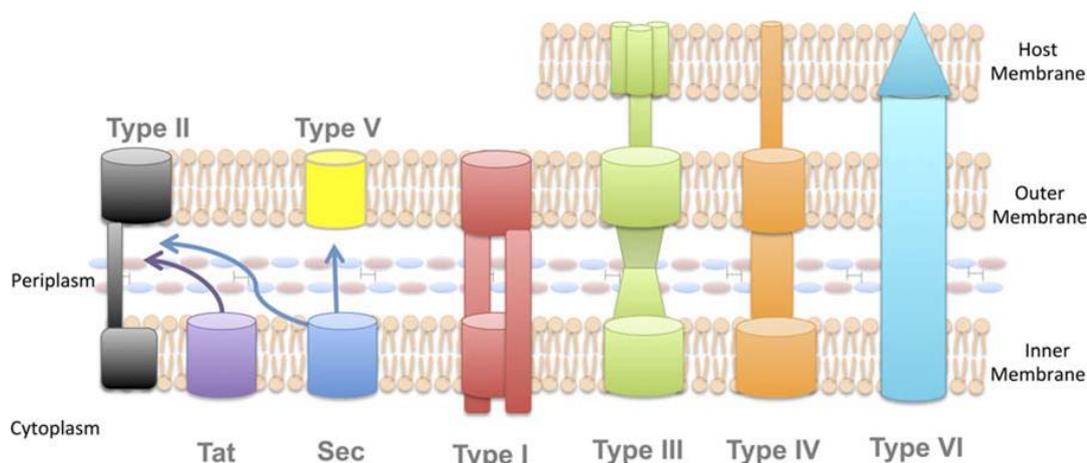


Figura 1 – Estrutura básica de sistemas de secreções em bactérias gram-negativas. Os sistemas do tipo II e V dependem das vias de secreção Sec ou Tat enquanto os sistemas I, III, IV e VI liberam seus substratos de forma independente. Fonte: GREEN e MECSAS, 2016.

Portanto, os sistemas de secreção podem ser classificados de acordo com a sua estrutura física; número de etapas no momento da secreção; se estão presentes em bactérias gram-negativas ou positivas (apenas o tipo VII é presente em gram-positivas); em qual região terminal da proteína a ser secretada se encontra a sequência sinalizadora de secreção e se os substratos são transportados enovelados ou não. Apesar de todas essas informações serem conhecidas para a maior parte dos sistemas, não se conhece ainda sobre o sinal de secreção do sistema de secreção do tipo VI (SST6) e nem sobre a forma exata como seus substratos são secretados (GREEN e MECSAS, 2016), já que esse sistema é um dos mais recentemente descobertos e ainda há muito para ser estudado sobre sua atuação.

1.3 Sistema de secreção do tipo VI (SST6)

O SST6 foi descrito pela primeira vez em 2006 em *Vibrio cholerae* (PUKATZKI, e colab., 2006) e hoje sabemos que ele está presente em um quarto de todas as bactérias gram-negativas incluindo espécies como: *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Yersina enterocolitica*, *Aeromonas sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia sp*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xyloxidans* (RUSSELL e colab., 2014). Durante a

interação procarioto-procarioto o SST6 oferece uma vantagem competitiva em ambientes variados (MACINTYRE e colab., 2010; DONG e colab., 2015), e assim como para células eucariotas e o transporte de proteínas ocorre de forma dependente de contato (HAYES e colab., 2010). *B. cenocepacia* e *P. aeruginosa* ativam o sistema de secreção durante a infecção de pacientes com fibrose cística (AUBERT e colab., 2016; MOUGOUS e colab., 2006). *B. thailandensis* possui 5 cópias de grupamentos de genes que codificam o SST6 e algumas cópias são utilizadas nas interações com eucariotos e outras com procariotos (SCHWARZ e colab., 2010). Em *E. coli* o SST6 está envolvido com a capacidade de aderência e invasão de células epiteliais e na replicação intracelular em macrófagos de linhagem (DE PACE, e colab., 2010).

Estruturalmente a montagem do aparato do SST6 se assemelha a cauda de um bacteriófago invertida (PUKATZKI, colab., 2007). Atualmente sabe-se que mais de 20 proteínas podem fazer parte do SST6 e que esse contém 13 componentes altamente conservados entre as diferentes espécies bacterianas, patogênicas ou não, que compõem a estrutura central desse sistema (BOYER e colab., 2009; BINGLE e colab., 2008).

As proteínas HcP (proteínas co-reguladoras de hemolisinas) e VgrG (proteínas G de repetições em valina e glicina) foram as primeiras identificadas como fundamentais para a montagem de sistema e hoje sabe-se que além do seu papel estrutural, elas também podem ser secretadas através do SST6 (WEBER, e colab., 2013). Durante a montagem do nanotubo (figura 2), um trímero de VgrG juntamente com outras proteínas do SST6, proteínas PAAR, e outras proteínas efetoras se agregam na base da membrana interna possibilitando a formação da base que dará início ao tubo e sua bainha. Hexâmero de HcP são então recrutados e começam a montagem do tubo em uma conformação que possibilita a montagem de uma bainha composta pelas subunidades VipA e VipB ao seu redor. Mudanças conformacionais no complexo da base desencadeiam uma contração da bainha o que faz com que o tubo de HcP seja empurrado, juntamente com o complexo VgrG/PAAR/efetores, da membrana bacteriana para o meio extracelular ou através da membrana da célula hospedeira (BASLER, 2015). O complexo da membrana é estável e pode ser utilizado mais de uma vez para outras injeções, entretanto a bainha contrátil tem suas subunidades reconhecidas por uma ATPase da família Clp, a ClpV, a qual desmonta a estrutura e recicla as subunidades para que sejam

utilizadas novamente (DOUZI e colab., 2016). Outra subunidade fundamental é a proteína IcmF (proteína de multiplicação intracelular F) que contém vários domínios transmembrana fazendo parte, juntamente com outras subunidades, do complexo membranar (COSTA e colab., 2015) e ainda exibe atividade de ATPase (MA e colab., 2012). Durante a infecção com *Vibrio cholerae*, a proteína IcmF esteve envolvida na adesão a células epiteliais (DAS e colab., 2002).

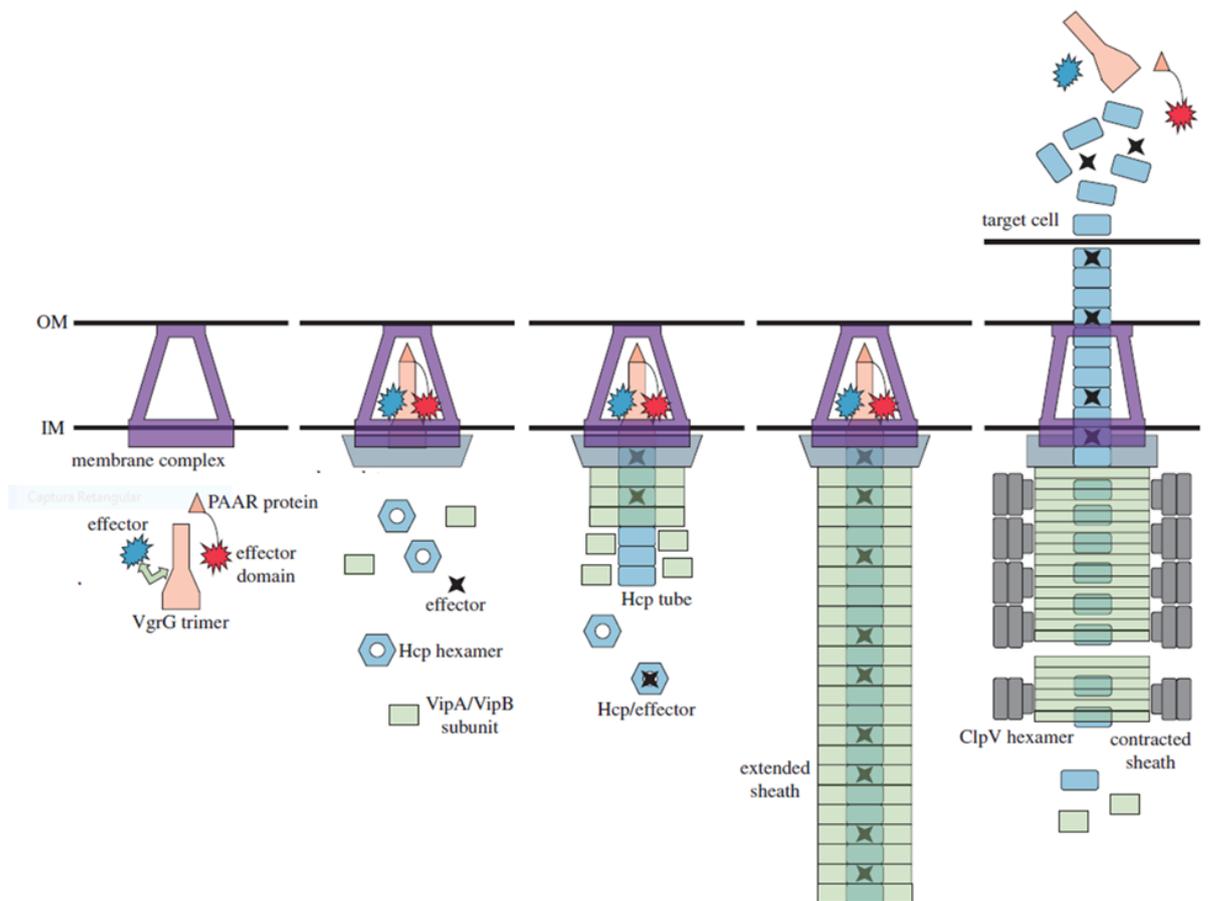


Figura 2 - Montagem do SST6. Adaptado de: (BASLER, 2015).

Como nenhum sistema de secreção é constitutivamente ativo, eventos sinalizadores são necessários para sua ativação, por exemplo o reconhecimento de receptores de uma célula hospedeira pode se encaixar nesse papel (GERLACH e HENSEL, 2007).

1.4 Resposta Imune contra infecção bacteriana

O tecido epitelial constitui a primeira barreira mecânica encontrada por bactérias durante uma infecção, adicionalmente esse tecido ainda pode produzir peptídeos antimicrobianos que atuam nesse combate. Entretanto, é a partir da ativação da imunidade inata que temos a primeira linha de defesa que utiliza mecanismos celulares e bioquímicos complexos (CALICH, 2009). A partir do reconhecimento de bactérias por meio de receptores especializados, o sistema imune passa então a recrutar fagócitos, outras células imunológicas, e secretar citocinas e quimiocinas no local da infecção, com o objetivo de atuarem por meio de mecanismos microbicidas contra o patógeno e também ativação da resposta imune adaptativa por meio da apresentação de antígenos (MURPHY, 2014).

Além das citocinas pró-inflamatórias, a produção de óxido nítrico se encaixa em um dos mecanismos microbicidas ativados por células infectadas após o desencadeamento da resposta inflamatória (WINK e colab., 2011). Um importante marcador da ativação inflamatória é a organela corpúsculo lipídico (CL) que está intimamente relacionada à inflamação (BOZZA e colab., 2009) por ser sítios de síntese de eicosanoides e de acúmulo de citocinas. O aumento da biogênese dessa organela foi relatado em diversos tipos celulares infectados com diferentes bactérias (BOZZA e colab., 2009).

A resposta imune inata contra patógenos é baseada na ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem estruturas comuns a grupos de microrganismos semelhantes (MEDZHITOV e JANEWAY, 1996), os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que variam desde componentes da parede celular até estruturas de ácidos nucleicos únicas aos patógenos (MURPHY, 2014). Diversos tipos de receptores intracelulares ou de membrana tem a capacidade de reconhecerem PAMPs e eles são expressos em um vasto número de células epiteliais ou imunológicas. A família de PRRs é constituída por receptores *toll-like* (TLRs); receptores de lectina tipo-C; receptores (*RIG*)-*I-like* (RLRs); receptores *NOD-like* (NLRs) e receptores *AIM2-like* (STOREK e MONACK, 2015). A partir de uma infecção microbiana, alguns PRRs promovem uma resposta pró-inflamatória e antimicrobiana através da ativação de fatores de

transcrição como NF κ B e IRFs, e podem desencadear a montagem e ativação de complexos multiproteicos citosólicos conhecidos como inflamassomas (MARTINON e colab., 2002).

1.5 Inflamassoma

O termo inflamassoma foi utilizado pela primeira vez em 2002 quando Martion e colaboradores descreveram um complexo multiproteico intracelular que era montado a partir do reconhecimento de PAMPs ou DAMPs (padrões moleculares associados a perigo) e que culminavam com a auto clivagem de caspase 1, uma protease dependente de cisteína, iniciando uma cascata de sinalização para a maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (MARTINON e colab., 2002). A ativação de caspase 1 resulta ainda na indução de um tipo de morte celular programada e pró-inflamatória conhecida como piroptose (BERGSKAKEN e colab., 2009).

A montagem do complexo ocorre através do reconhecimento entre os domínios CARD (domínio recrutador de caspase) e PYD (domínio *pyrin*) das subunidades do complexo que permite a interação entre os receptores NLRs ou AIM2 e a pró-caspase 1 (BROZ e DIXIT, 2016). Diferentes inflamassomas já foram descritos baseando sua estrutura em diferentes NLRs como NLRP1, NLRP3, NLRC4 (IPAF), NLRC5 entre outros. (MARIATHASAN e MONACK, 2007). Alguns inflamassomas utilizam da proteína adaptadora ASC (proteína *speck-like* associada a apoptose) para realizar a ligação entre o sensor NLR e a caspase 1 já que proteína ASC é composta por um domínio *pyrin* e um domínio CARD, porém nem todos os inflamassomas são dependentes de ASC. Já foi demonstrado que a oligomerização de ASC pode afetar diretamente a maturação de IL-1 β , mas a auto proteólise de caspase 1 assim como a indução de piroptose podem ocorrer na ausência de ASC (BROZ e colab., 2010)(Fig 3).

O mecanismo de ativação do inflamassoma NLRP3 é o mais esclarecido atualmente. Inicialmente, é necessário reconhecimento de um estímulo extra celular resultando em uma cascata de sinalização que aciona o fator de transcrição NF κ B para regular a transcrição de NLRP3, pró-IL-1 β , pró-IL18 e também pró-caspase1 (BAUERNFEIND e colab., 2009). Embora se saiba como o NLRP3 é ativado ainda não há um consenso sobre como ocorre sua oligomerização para posterior exposição para interação com a ASC, entretanto vários mecanismos tem sido

propostos sendo o mais promissor relacionado ao efluxo de potássio (BROZ e DIXIT, 2016).

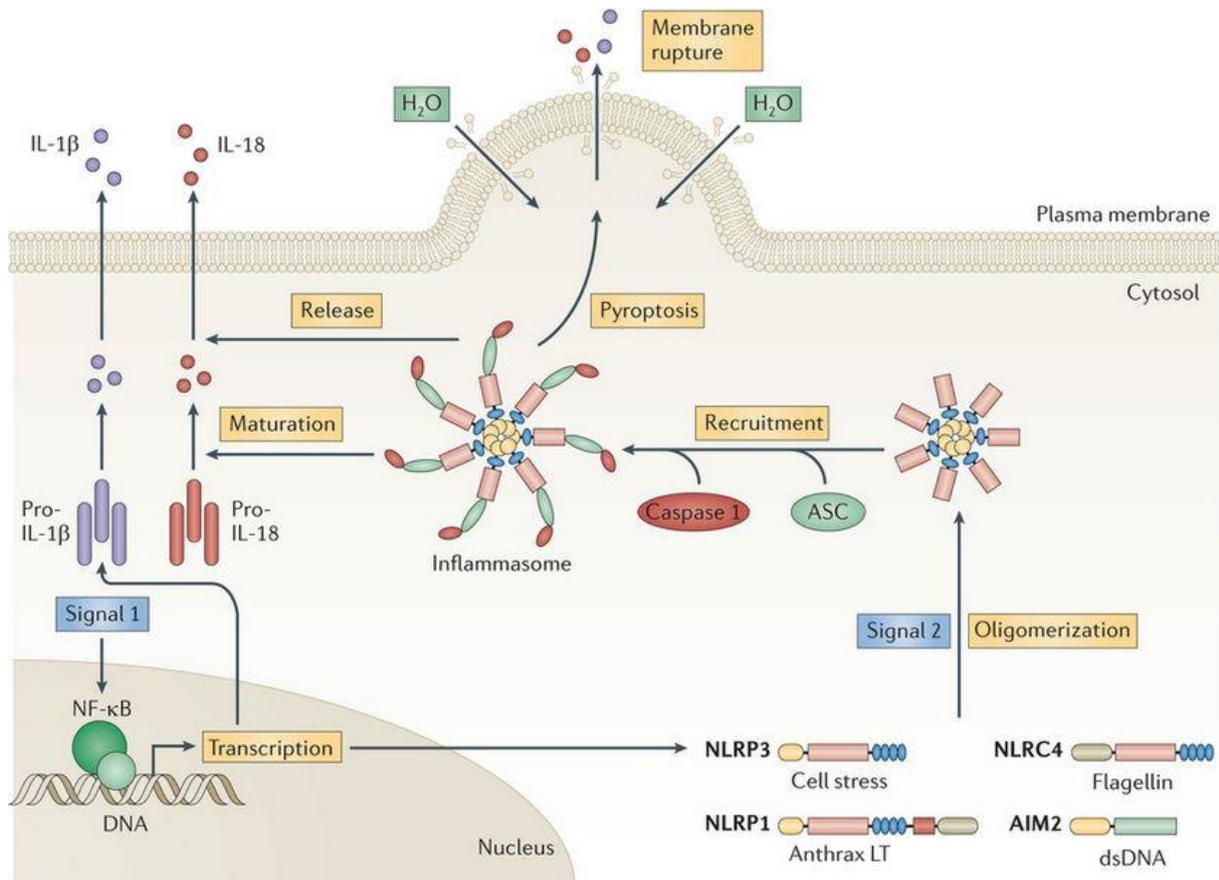


Figura 3 – Modelo de ativação do inflamassoma. Fonte: (WALSH e colab., 2014).

A secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 é de extrema relevância para que o sistema imune consiga controlar a infecção de patógenos intracelulares e promover a ativação da resposta imune adaptativa, sendo que a secreção de IL-18 acaba por ter efeitos menos danosos quando comparada com IL-1 β que causa um maior dano tecidual (RATNER e colab., 2017).

As proteínas caspase 11, para camundongos, e as caspases 4 e 5, ortólogos humanos, desempenham um papel fundamental em uma via de ativação não canônica para clivagem de caspase 1 (KAYAGAKI e colab., 2011). O LPS de bactérias gram-negativas é capaz de ativar a caspase 11 de forma independente, essa forma ativa então promove a clivagem de caspase 1 de forma dependente de NLRP3 (BROZ e DIXIT, 2016). Estudos recentes mostraram ainda que um dos principais mecanismos para indução de piroptose é através da clivagem de gasdermina D, a qual é clivada pela caspase 11 ativa (KAYAGAKI, N e colab.,

2015). Isso explica porquê a piroptose pode ser diretamente desencadeada por caspase 11 de forma independente de caspase 1 (BROZ, Peter e colab., 2013)(Fig 4).

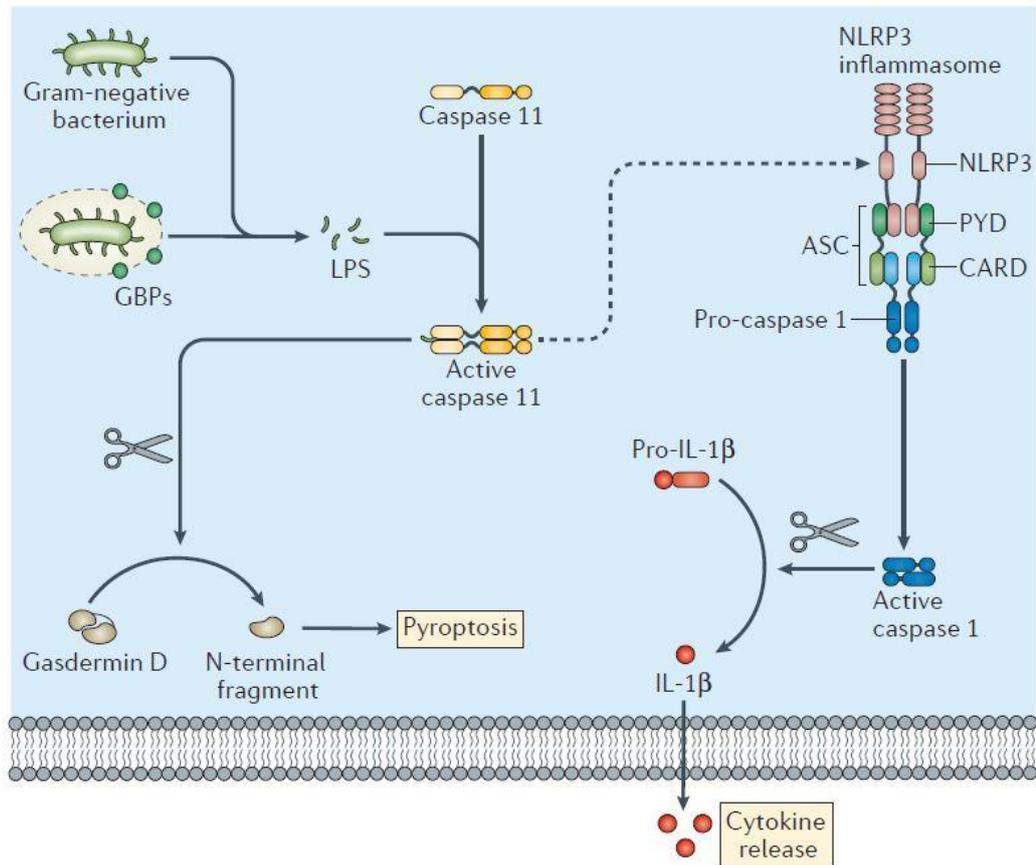


Figura 4 – O papel da caspase 11 para ativação não canônica do inflamassoma e durante a indução de piroptose. Fonte: (BROZ, Petr e DIXIT, 2016).

Considerando o papel, a complexidade, bem como a relevância da ativação dos inflamassomas e o seu papel fundamental para resposta imune inata, é de se esperar que moléculas efetoras dos sistemas de secreção bacterianos afetem direta ou indiretamente essas vias de ativação. Infecções causadas por *Salmonella spp*, *Legionella pneumophila*, *P. aeruginosa* dentre outras bactérias são caracterizadas por induzirem ativação dos inflamassomas utilizando efetores de seus sistemas de secreção (Fig 5). *L. pneumophila* induz a clivagem de caspase 1 e liberação de IL-1 β através do bem caracterizado sistema Dot/Icm (SILVEIRA e ZAMBONI, 2010). *S. Typhimurium* expressando o sistema de secreção tipo III (SST3) induz a secreção de IL-1 β dependente da ativação de NLRC4 (FRANCHI e colab., 2006). *Yersinia spp*

ativa tanto o inflamassoma NLRP3 quanto NLR4 de forma dependente do SST3 (ZWACK e colab., 2015; BRODSKY e colab., 2010). Durante a infecção por *Shigella* o SST3 parece ser capaz de induzir autofagia o que acabou por inibir a ativação do inflamassoma (SUZUKI e colab., 2007). Uma proteína efetora do SST6, TecA, foi associada com a ativação do inflamassoma *pyrin* durante a infecção por *B. cenocepacia* (AUBERT e colab., 2016), porém o papel de outros efetores do SST6 durante ativação dos inflamassoma por outras bactérias permanece desconhecido.

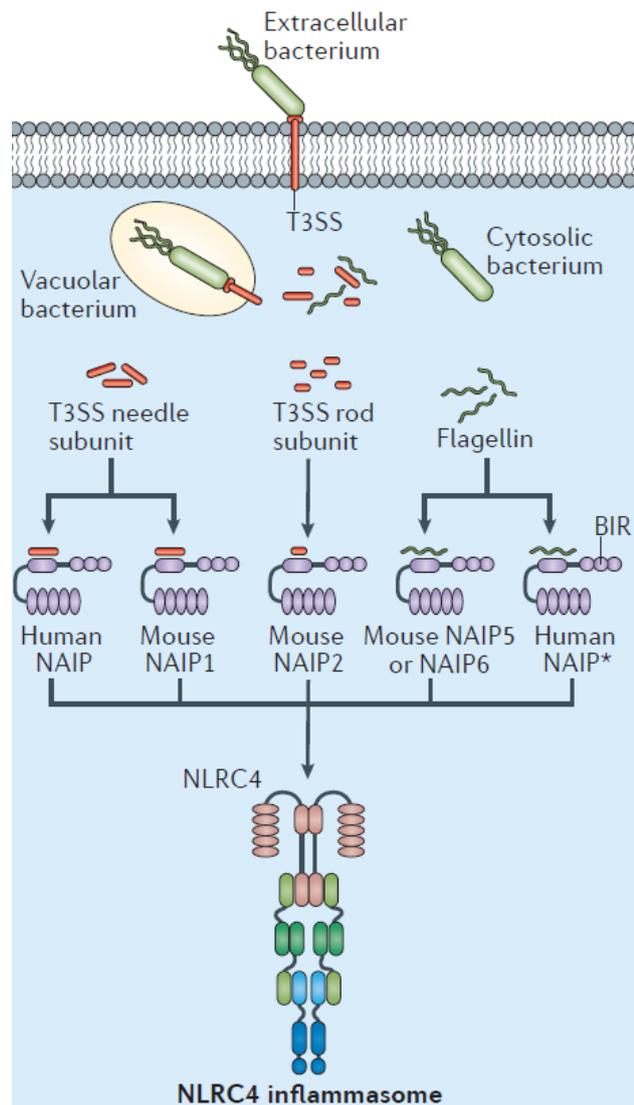


Figura 5- Ativação do inflamassoma a partir de subunidades bacterianas. Fonte: (BROZ, Petr e DIXIT, 2016).

Nem sempre os mecanismos de ativação da resposta imune são suficientes para resolução de uma infecção. Isso ocorre pois ao curso da evolução várias bactérias desenvolveram mecanismos onde se torna possível o escape da resposta imune e para isso fazem uso de seus sistemas de secreção. Durante a infecção com *Brucella* um fator de virulência associado ao sistema de secreção tipo IV participa da

inibição da resposta imune e controla o tráfego de vesículas do hospedeiro (KE e colab., 2015), já ao longo da infecção com *Coxiella burnetii* esse sistema de secreção modula o transcriptoma do hospedeiro (WEBER, Mary M. e colab., 2015). Efetores do sistema de secreção tipo III atuam na destruição do fagossomo em células infectadas por *Shigella* (YANG e colab., 2015), e inibem a ativação do inflamassoma NLRP3 em durante a infecção de *E. coli* em monócitos humanos (YEN e colab., 2015).

Embora se saiba que o SST6 participa ativamente no estabelecimento da infecção de várias bactérias promovendo uma resposta inflamatória, ainda não estão esclarecidos todos os mecanismos e vias de ativação utilizadas durante a infecção por *E. coli* causadoras de infecções extra-intestinais e nem o papel da ativação dos inflamassomas nesse processo.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Investigar o papel do sistema de secreção do tipo VI sobre a resposta imunológica e inflamatória causada pela infecção por *E. coli*, analisando a ativação dos inflamassomas durante esse processo.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Investigar se a ativação de mecanismos relacionados ao metabolismo redox mecanismos e pró-inflamatórios em macrófagos durante a infecção com *E. coli* são dependentes de efetores do SST6.
- II. Analisar o papel do SST6 e seus efetores durante a ativação dos inflamassomas Nlrp3 e Nlrc4 em infecções *in vitro* e *in vivo*.
- III. Caracterizar o papel do SST6 e de moléculas relacionadas ao inflamassomas para a replicação intracelular e estabelecimento da infecção por *E. coli in vitro* e *in vivo* .
- IV. Averiguar qual o papel das caspases 1 e 11 e do receptor Nlrp3 durante a indução de outros mecanismos celulares da resposta imune ativação do inflamassoma bem como de efetores do SST6 durante a apresentação de antígenos lipídicos.
- V. Avaliar a biogênese de corpúsculos lipídicos durante a infecção com *E. coli* caracterizando o papel do SST6 nesse processo assim como dos inflamassomas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo.

As cepas de *E. coli* utilizadas nesse trabalho pertencem à coleção do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) sob a coordenação do Prof. Wanderley da Silveira. SEPT 362, cepa APEC selvagem e mutantes isogênicos para as proteínas ClpV (Δ ClpV), e IcmF (Δ IcmF) foram cultivadas aerobicamente à 37 °C em meio LB líquido suplementado com estreptomicina (100 µg/ml), ampicilina (100 µg/ml) e tetraciclina (50 µg/ml). Crescimento bacteriano para infecção foi realizado em cultivos de 12 horas.

3.2 Camundongos e considerações éticas

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 e derivados mutantes: *Caspase 1-11-/-*, *Nlrp3-/-*, *Asc-/-* e *Nlrc4-/-*. Os animais foram mantidos nas instalações do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), bem como na Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (USP/RP). Todos os cuidados e experimentos envolvendo os animais foram realizados acordo com as diretrizes institucionais aprovadas pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UnB e da USP/RP. Os camundongos foram utilizados para obtenção de macrófagos derivados de medula óssea e para ensaios *in vivo*, onde para cada grupo experimental foram utilizados 5 animais.

3.3 Macrófagos derivados de medula óssea

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram obtidos como descrito previamente (MARIM e colab., 2010). Fêmures e tíbias oriundos de C57BL/6 tiveram suas cavidades ósseas lavadas com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para liberação das células da medula óssea. Essas células foram mantidas em

cultura à 37° C e 5 % de CO₂ em placas de petri sem tratamento para aderência durante todo período de diferenciação. O meio de diferenciação é composto por: RPMI 16140, 20% de soro fetal bovino (Gibco), 30% de meio condicionado de células L-929 (LCCM) e 1% de penicilina-estreptomicina. Após o oitavo dia de diferenciação os macrófagos obtidos eram devidamente plaqueados e mantidos em RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino e 5% de LCCM.

3.4 Condições de infecção *in vitro*

BMDMs foram plaqueados em placas de 24, 48 ou 96 poços a depender do ensaio. As diferentes cepas de *E. coli* eram quantificadas por espectrofotometria, sendo 1:100 o MOI utilizado. As células eram lavadas 1 hora após a infecção com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e meio RPMI 1640 suplementado com 40µg/ml de gentamicina era adicionado posteriormente.

3.5 Pré tratamento com C75

Com o objetivo de avaliar os efeitos da inibição da enzima ácido graxo sintase durante a infecção por *E. coli* em BMDMs, estas células foram pré-tratadas com 1µM de C75 (4-Methylene-2-octyl-5-oxotetrahydrofuran-3-carboxylic acid) (Sigma- Aldrich) por 1 hora antes da infecção onde permaneciam em condição de cultivo. Após a adição de meio suplementado com gentamicina que ocorria após 1 hora da infecção o C75 era novamente adicionado para que o efeito da inibição continuasse durante a infecção. As células tratadas foram analisadas quanto a biogênese de corpúsculo lipídico assim como a replicação intracelular bacteriana.

3.6 Condições de infecção *in vivo*

Camundongos de 8 à 12 semanas foram infectados intraperitonealmente com 10⁷ bactérias diluídas em 100 µL de PBS e foram mantidos por 24 horas. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg,

respectivamente) para retirada do sangue e então sacrificados para coleta de órgãos e realização de lavado peritoneal.

3.7 Quantificação de células bacterianas viáveis em BMDM ou em camundongos infectados

Para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após infecção em BMDM, as células foram lisadas com a utilização do detergente Triton 0,02%. O lisado celular foi então diluído em PBS estéril e colocado em placa do meio seletivo MacConkey ágar (Sigma-Aldrich) para crescimento bacteriano. Também foi analisado o número de UFC da região peritoneal de animais infectados assim como do baço e fígado desses animais. Os órgãos foram coletados e colocados em meio LB líquido para manutenção das bactérias viáveis, foram pesados e posteriormente macerados e homogeneizados. Os tecidos homogeneizados foram diluídos e colocados em placas de MacConkey ágar. Após obtenção de imagem digital das placas a contagem de colônias foi realizada com o software ImageJ.

3.8 Dosagem de citocinas

O sobrenadante livre de células oriundo de BMDM (ensaios *in vitro*), lavado peritoneal assim como o soro das amostras de sangue (ensaios *in vivo*) foram analisados quanto aos níveis de diferentes citocinas secretadas utilizando o método ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL) a partir da leitura em 450 nm no aparelho SpectraMax.

3.9 Dosagem de óxido nítrico

Os níveis óxido nítrico foram mensurados indiretamente a partir do acúmulo de nitrito no sobrenadante de BMDM utilizando o teste de Griess. As amostras foram misturadas junto com o reagente de Griess (1% sulfanilamide, 0,1% naphthylene diamine dihydrochloride, 2,5% H₃PO₄) em proporção 1:1 e 10 minutos depois a absorbância foi determinada em 550 nm no SpectraMax.

3.10 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para análise da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi utilizada a sonda 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DFC-DA- Sigma Aldrich) e a sonda Cell-Rox (Invitrogen) com as quais as células foram incubadas a 37°C e adquiridas imediatamente após a marcação no citômetro BD FACS Verse. Durante a análise de dados no software FlowJo apenas as células viáveis foram consideradas, excluindo ainda a população de *doublets*.

3.11 Análise da apresentação de antígenos lipídicos

A expressão de CD1d na membrana celular foi analisada através do uso de anticorpo anti-CD1d conjugado à ficoeritrina (PE) (Ebioscience). Após marcação com o anticorpo as células foram posteriormente adquiridas no citômetro de fluxo (BD FACS Verse). Durante a análise de dados no software FlowJo apenas as células viáveis foram consideradas, excluindo ainda a população de *doublets*.

3.12 Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos

Para análise da biogênese de corpúsculos lipídicos a sonda fluorescente BODIPY 493/503 (Life Technologies) foi empregada. Essa sonda se associa aos lipídeos neutros intracelulares que estão presentes de forma abundante nos corpúsculos lipídicos. Após incubação com a sonda, as células foram fixadas para posterior aquisição no citômetro de fluxo. Durante a análise de dados no software

FlowJo apenas as células viáveis foram consideradas, excluindo ainda a população de *doublets*.

3.13 Análises por Western Blot

Os lisados celulares e os sobrenadantes foram fervidos com tampão Laemmli , separadas por SDS-page e transferidos (Semidry Transfer Cell, Bio-Rad) para membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (GE Healthcare). Os anticorpos utilizados para detecção de antígenos foram: anti-caspase1 subunidade p20 (Genentech), bem como anti-caspase1 que reconhece tanto a pro-caspase1 quanto sua subunidade p20 (Abcam).

3.14 Análise da ativação de caspase 1

Para marcação de caspase 1 ativa após o tempo adequado de infecção os macrófagos foram incubados com a sonda FLICA FAM-YVAD-FMK, que se liga de forma irreversível a uma subunidade de caspase 1 clivada. Imediatamente após a incubação as células foram lavadas e adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS Verse. Durante a análise de dados no software FlowJo apenas as células viáveis foram consideradas, excluindo ainda a população de *doublets*.

3.15 Análise estatística

Os dados foram representados graficamente e analisados através do software GraphPad Prism 6.0. utilizando teste T .

4. Resultados e Discussão

Infecções bacterianas ainda são relacionadas há um alto índice de mortalidade em diversas patologias. A compreensão do papel dos sistemas de secreção durante a interação parasito-hospedeiro avança os estudos que procuram melhores formas de combate a essas infecções. A descoberta do SST6 é recente e as descrições iniciais desse sistema eram atribuídas apenas ao seu papel durante o estabelecimento de bactérias entre outros microrganismos, sendo ainda mais atual a busca da relação de seus efetores com as infecções em células eucariotas (ALCOFORADO DINIZ e colab., 2015). Nesse trabalho utilizamos uma cepa patogênica de *E. coli* extra intestinal, SEPT 362, e duas cepas com deleção de duas principais proteínas efetoras do SST6, Δ ClpV e Δ IcmF, descrevendo o papel desses efetores durante a resposta inflamatória e estabelecendo pela primeira vez sua relação com a ativação do inflamassoma dependente do SST6 em um modelo de infecção por *E. coli*.

4.1 A secreção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela infecção com SEPT 362 é dependente do SST6.

Citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 12 (IL-12), IL-8, IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) são produzidas por células hospedeiras e tem um papel fundamental no combate a infecção bacteriana (MOGENSEN, 2009). Essas citocinas podem aumentar a capacidade bactericida de células hospedeiras assim como atuar durante o recrutamento de outros componentes da resposta imune ao sítio da infecção (HORNEF e colab., 2002).. Pace e colaboradores mostraram que o SST6 estava envolvido na capacidade de indução de citotoxicidade em macrófagos de linhagem da cepa SEPT 362 (DE PACE, Fernanda e colab., 2011). Tendo em vista essa capacidade virulenta e considerando a contribuição da produção de citocinas pró-inflamatórias para a imunidade do hospedeiro e a patogênese (MOGENSEN, 2009), investigamos qual seria o perfil de secreção de IL-12 (Fig 6 A) e TNF- α (Fig 6 B) em BMDMs infectados com as cepas de *E. coli* SEPT 362 e mutantes para o SST6 Δ ClpV e Δ IcmF. Verificamos que a cepa selvagem, SEPT 362, induz um aumento na secreção de IL-12 que é altamente dependente de ClpV, e IcmF já que a infecção com as cepas mutantes reduziu

significativamente a secreção dessa citocina (Fig 6 A). O aumento da indução de TNF- α se mostrou dependente apenas da presença da proteína lcmF e independente de ClpV (Fig 6 B). Investigamos ainda se o SST6 participa na indução de IL-6 em camundongos infectados com *E. coli*. Analisando a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 24 horas após a infecção com SEPT 362, Δ ClpV, e Δ lcmF observamos que o aumento da secreção de IL-6 é dependente da presença das proteínas ClpV e lcmF (Fig 6 C). A secreção de IL-6 e IL-17 é mediada por ClpV ao longo da infecção com *Bordetella bronchiseptica* (WEYRICH e colab., 2012). O uso de outra proteína efetora do SST6, HcP, para estímulo de células endoteliais cerebrais humanas mostrou a dependência dessa proteína para a secreção de IL-6 e IL-8 em um modelo de meningite induzida por *E. coli* (ZHOU e colab., 2012). A dependência das proteínas ClpV, para secreção de TNF- α em macrófagos infectados, e lcmF, para IL-12 e TNF- α em macrófagos e IL-6 em animais infectados com *E. coli* corrobora com esses trabalhos exceto pelo fato de mostrarmos a dependência de ClpV na indução de TNF- α , o que não ocorre, segundo Weyrich e colaboradores, durante a infecção com *Bordetella bronchiseptica* (WEYRICH e colab., 2012).

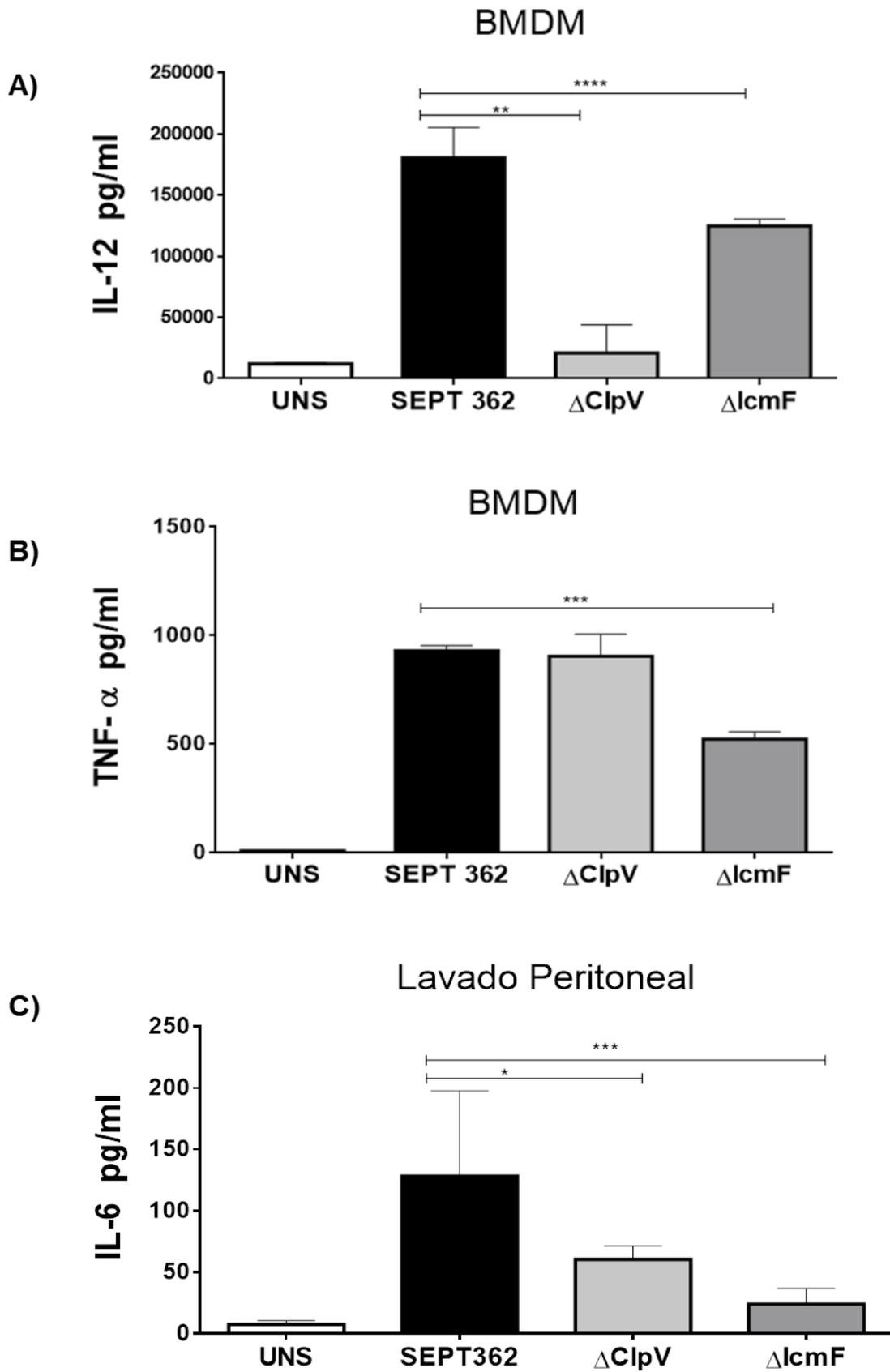


Figura 6 - O SST6 influencia na secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos infectados por *E. coli* *in vitro* e *in vivo*.

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 foram infectados, MOI 100, com as cepas SEPT 362, Δ ClpV e Δ IcmF, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40 μ g/mL de gentamicina e as células permaneceram em cultura até 24 horas. Após esse tempo os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas IL-12 (A) e TNF- α (B). Camundongos C57BL/6 foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10⁷ das cepas SEPT 362, Δ ClpV e Δ IcmF e mantidos por 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS. Após o tempo de estímulo foram realizados lavados peritoneais onde células e sobrenadante foram separados através de centrifugação, foi verificada então a presença da citocina IL-6 nesse sobrenadante (C). As dosagens foram realizadas pelo método ELISA e os dados de absorbância obtidos no software através do aparelho SpectraMax. Os dados em (A) e (B) são representativos de três experimentos independentes. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.2 SEPT 362 modula a produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio.

Já é bem estabelecido na literatura que moléculas que participam do chamado metabolismo redox, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) participam ativamente como mediadores inflamatórios, onde essas moléculas podem estar atuando em conjunto ou separadamente (WINK e colab., 2011). Macrófagos infectados com SEPT 362 induziram uma alta produção de óxido nítrico, entretanto durante a infecção com Δ ClpV e Δ IcmF esses níveis foram reduzidos (Fig 7 A). Este evento evidencia que a infecção com SEPT 362 estimula uma maior resposta inflamatória em BMDM e que as ATPases ClpV e IcmF participam diretamente desse mecanismo. Ao contrário do que era inicialmente esperado, a infecção por SEPT 362 *in vitro* (Fig 7 B e C) assim como *in vivo* (Fig 7 D e E) proporcionou uma redução nos níveis de ROS, enquanto a infecção com as cepas mutantes revertia parcialmente parte desse efeito. A descoberta que a infecção por SEPT 362 foi capaz de diminuir a geração de ROS foi contrária ao esperado, e devido a dependência das proteínas ClpV e IcmF a primeira hipótese que nos ocorreu foi o estabelecimento de um mecanismo de escape dependente do SST6.

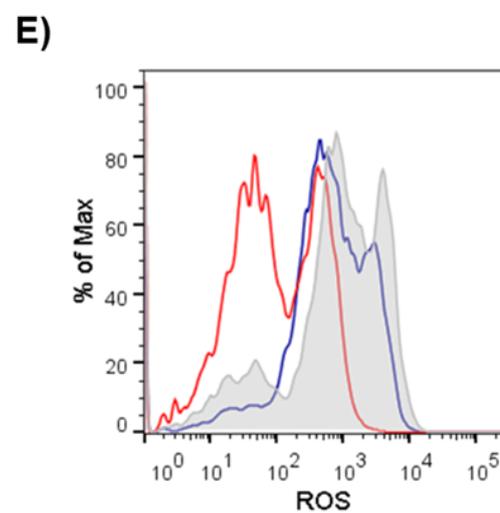
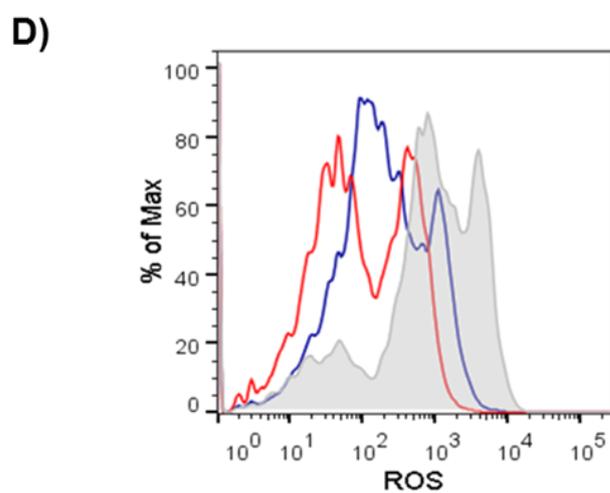
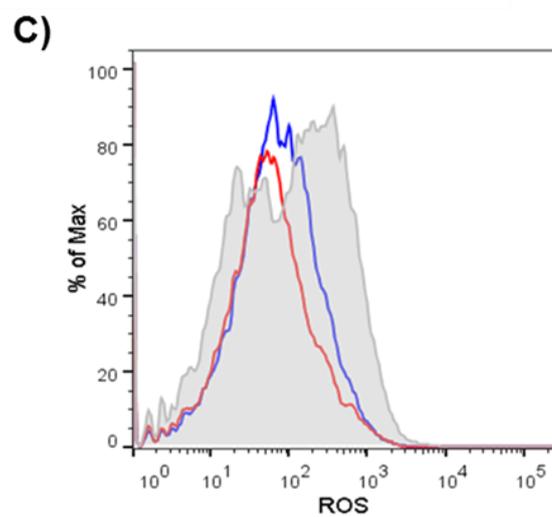
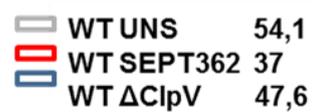
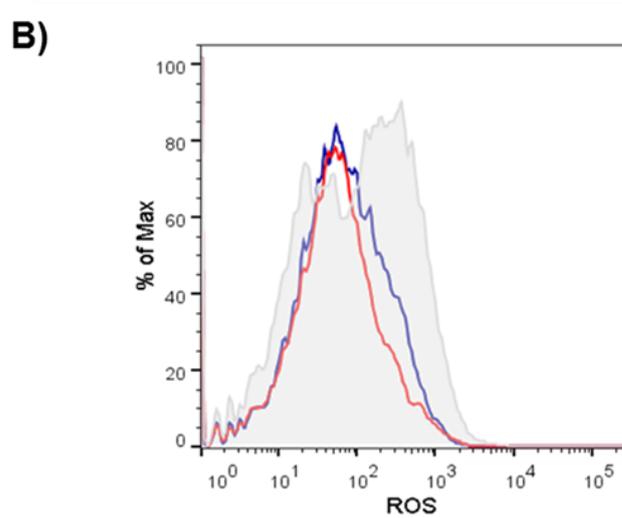
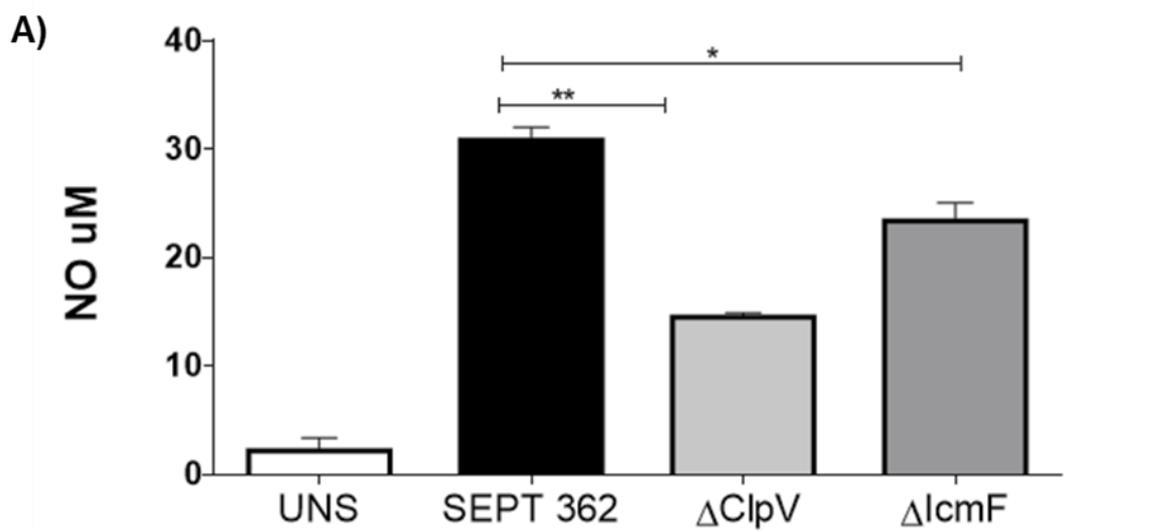


Figura 7 – Modulação dos níveis de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio a partir da infecção com SEPT 362, Δ ClpV e Δ IcmF.

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 foram infectados, MOI 100, com as cepas SEPT 362, Δ ClpV e Δ IcmF, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40 μ g/mL de gentamicina e as células permaneceram em cultura por diferentes períodos de tempo. Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados para averiguar a presença de óxido nítrico (A). Após 3 horas os macrófagos foram lavados com PBS e incubados com a sonda fluorescente Cell-Rox (B e C) por 1 hora à 37°C, após o tempo de incubação as células foram desaderidas e preparadas para aquisição imediata no citômetro de fluxo. Camundongos C57BL/6 foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10⁷ das cepas as cepas SEPT 362, Δ ClpV e Δ IcmF e mantidos por 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS (D e E). Após o tempo de estímulo foi realizado um lavado peritoneal onde as células coletadas foram então incubadas com DFCDA por 1 hora à 37°C e então preparadas para aquisição imediata no citômetro de fluxo. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.3 O SST6 atua durante a replicação intracelular de *E. coli* em macrófagos e influencia a capacidade de colonização do fígado e baço.

Outra estratégia para subversão da resposta imunológica utilizada por bactérias é a tentativa de escape da fagocitose, entretanto isso nem sempre é possível, sendo assim vários patógenos encontram formas de sobreviver e se replicarem dentro da própria célula hospedeira (HORNEF e colab., 2002). Para isso é necessário que esses patógenos sejam capazes de manipular o tráfego endossomal a fim de evitar a degradação no fagolisossomo (HORNEF e colab., 2002). Durante a infecção com *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* foi demonstrado a contribuição do SST6 na replicação intracelular em macrófagos, assim como na colonização do fígado e baço (MULDER e colab., 2012).

Nesse trabalho, observamos que a habilidade de replicação de *E. coli* no interior de macrófagos infectados foi reduzida quando na ausência das proteínas ClpV e IcmF (Fig 8 A) e que durante a infecção de camundongos C57BL/6 a cepa SEPT 362 tem uma maior capacidade de colonização do baço (Fig 8 B), e do fígado (Fig 8 C) quando comparada com a cepa Δ IcmF, evidenciando assim o papel do SST6 para sobrevivência bacteriana.

Como os sistemas de secreção estão diretamente relacionados à capacidade de colonização do hospedeiro, é esperado que haja uma relação direta entre seus efetores e a capacidade de replicação intracelular bacteriana. Da mesma forma que os outros sistemas de secreção, como a translocação de efetores via SST3 do vacúolo intracelular permite a replicação intracelular em macrófagos infectados com *Salmonella enterica* (FIGUEIRA e colab., 2013), identificamos que a ausência dos efetores ClpV e IcmF afeta diretamente a replicação de *E. coli*. Capacidade de replicação intracelular. Quando analisamos a distribuição sistêmica da infecção de *E. coli* para fígado e baço percebemos mais uma vez que a ausência da proteína IcmF reduz o potencial de colonização desses órgãos. Portanto é evidente que uma correta montagem do complexo membranal do SST6, o qual a proteína IcmF faz parte, é essencial para que esse sistema seja capaz de contribuir no estabelecimento da infecção do ponto de vista bacteriano

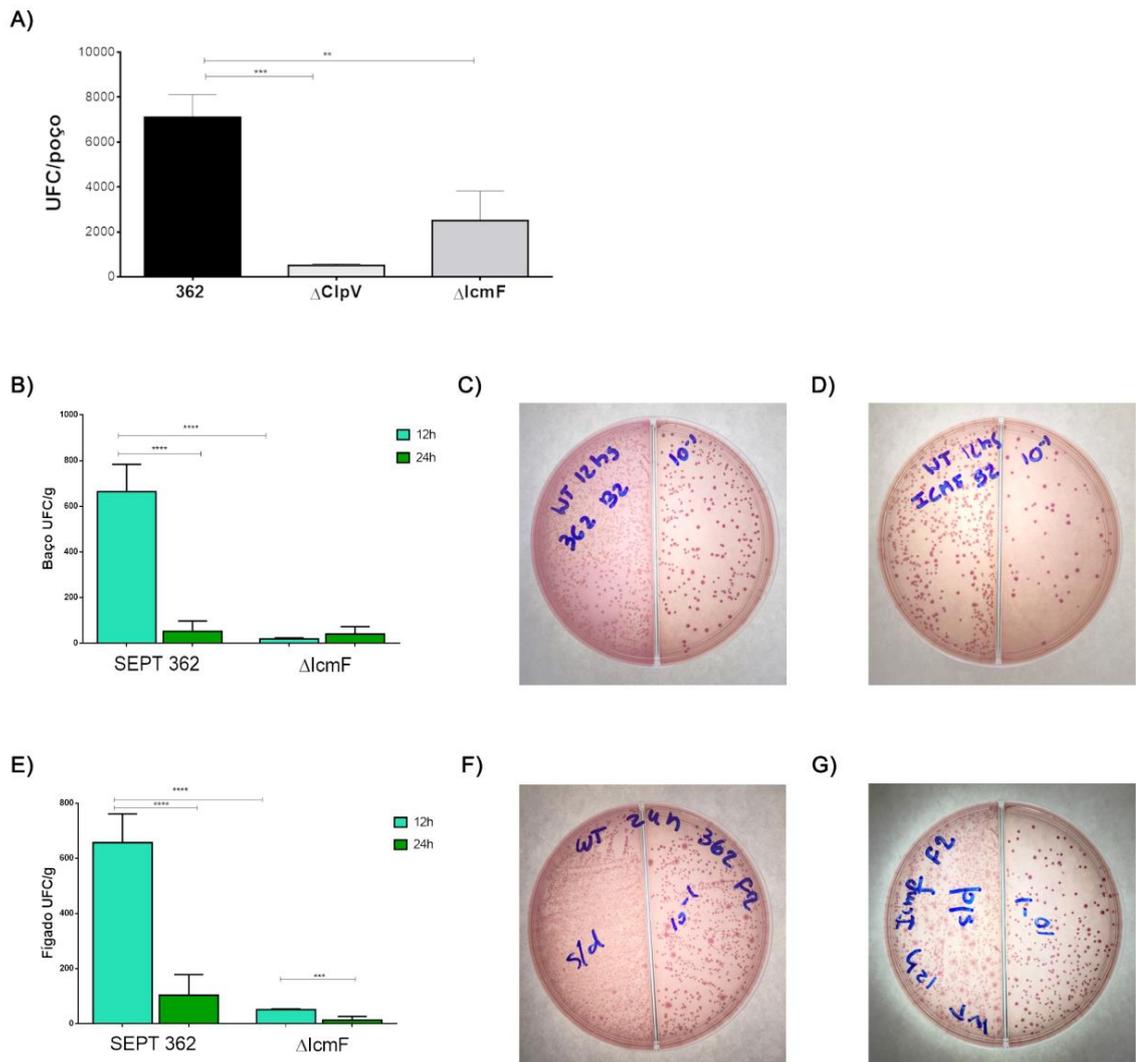


Figura 8 - O papel do SST6 na replicação intracelular e colonização de órgãos

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 foram infectados, MOI 100, com as cepas SEPT 362, Δ CipV e Δ lcmF, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40 μ g/mL de gentamicina e as células permaneceram em cultura. Após 6 horas os macrófagos foram lisados com triton e as bactérias internalizadas foram plaqueadas em diluições seriadas e colocadas em estufa a 37°C *overnight* para determinação de UFC (A). Camundongos C57BL/6 foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10⁷ das cepas SEPT 362 e Δ lcmF e mantidos por 12 e 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS. Ao término do estímulo os animais foram sacrificados para retirada de órgãos. Homogenatos do baço (B, C e D) e do fígado (E, F e G) foram diluídos e plaqueados em MacKonkey-ágar e mantidos na estufa *overnight*. As unidades formadoras de colônia foram determinadas levando em consideração o peso do órgão de cada animal e para melhor representação gráfica todos os valores de UFC foram divididos por 10. Asteriscos representam diferenças significativas onde p<0,05.

4.4 SEPT 362 induz a secreção de IL-1 β de forma dependente de lcmF e ClpV em macrófagos.

O reconhecimento de patógenos por receptores TLRs resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-18, anteriormente já demonstramos a atuação do SST6 na secreção de TNF- α e IL-6 (Fig 6), já IL-1 β e IL-18 requerem um sinal pós traducional por clivagem enzimática para que suas formas maduras sejam secretadas (RATNER e colab., 2017). Esse processamento enzimático ocorre classicamente pela ativação dos complexos do inflamassoma (GUO e colab., 2015). Trabalhos recentes descreveram o papel de uma proteína efetora do SST6, TecA, na ativação do inflamassoma *pyrin* através da análise do processamento de caspase 1 ao longo da infecção com *Burkholderia* (AUBERT e colab., 2016). (AUBERT e colab., 2016). Infectamos BMDMs por 24 horas com as diferentes cepas de *E. coli* e verificamos a dependência das proteínas lcmF e ClpV para indução da secreção de IL-1 β (Fig 9 A). A diminuição nos níveis de IL-1 β durante a infecção com Δ lcmF também foi observada durante ensaios in vivo (Fig 9 B). Nesse trabalho mostramos que a infecção por SEPT 362 foi capaz de ativar o inflamassoma induzindo aumento nos níveis de IL-1 β de forma dependente de ClpV e principalmente de lcmF, indo de encontro ao achado que a secreção de IL-1 β induzida pelo SST6 de *Bordetella bronchiseptica* é dependente de ClpV (WEYRICH e colab., 2012).

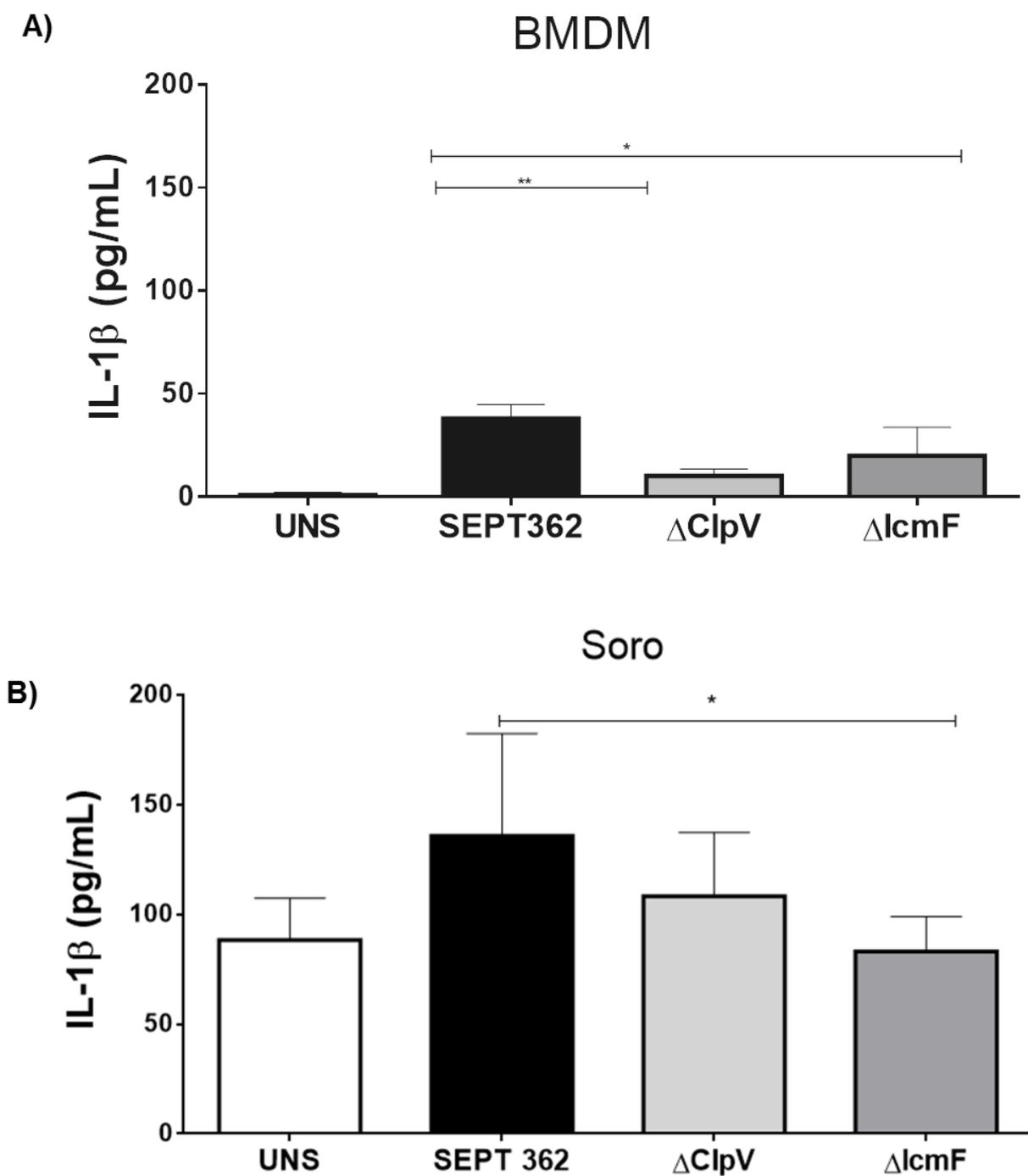


Figura 9 - O SST6 participa da indução de IL-1 β em macrófagos e camundongos infectados com *E. coli*.

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 foram infectados, MOI 100, com as cepas SEPT 362, Δ ClpV e Δ lcmF, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40 μ g/mL e gentamicina e as células permaneceram em cultura até 24 horas. Após esse tempo os sobrenadantes foram coletados para dosagem da citocinas IL-1 β (A). Camundongos C57BL/6 foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10⁷ das cepas SEPT 362, Δ ClpV e Δ lcmF e mantidos por 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS. Após o tempo de estímulo os camundongos tiveram o sangue coletado e o soro separado por centrifugação onde foi então verificada a presença de IL-1 β (B). As dosagens foram realizadas pelo método ELISA e os dados de absorbância obtidos no software através do aparelho SpectraMax. Os

dados em (A) são representativos de três experimentos independentes. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.5 Proteínas do SST6 participam da indução da auto proteólise de caspase 1 em macrófagos infectados com *E. coli*.

Com intuito de investigar se a infecção com *E. coli* induz a clivagem de caspase1 de forma dependente do SST6, infectamos BMDMs com SEPT 362 e as mutantes Δ CipV e Δ IcmF e o processamento da caspase1 foi analisado por western blot. No mesmo ensaio verificamos ainda se esse processo seria dependente de algumas proteínas que podem estar envolvidas na montagem do complexo do inflamassoma usando BMDMs provenientes de animais Nlrc4 $-/-$ e Asc $-/-$.

Verificamos que a infecção com SEPT 362 induz a clivagem de caspase1. Entretanto, as cepas Δ CipV e Δ IcmF não foram capazes de induzir essa clivagem (Fig 10 A) durante a infecção. De modo similar, ao marcarmos as células com a sonda FLICA capaz de detectar apenas a forma ativa de caspase1, verificamos uma maior porcentagem de células positivas que foram infectadas com SEPT 362 (Fig 10 D). Portanto esse processo é dependente das proteínas CipV e IcmF. Na ausência da proteína adaptadora ASC nós não observamos a clivagem de caspase1 durante a infecção com todas as cepas (Fig 10 C). Infecções em BMDMs provenientes de animais Nlrc4 $-/-$ mostraram o mesmo perfil encontrado em animais selvagens (Fig 10 B) . Apesar do inflamassoma NLRC4 ser classicamente ativado pelos sistemas de secreção tipo III e VI durante infecções com *S. typhimurium* e *L. pneumophila* (LAGE e colab., 2014), notamos que a ativação do inflamassoma dependente de SST6 é independente de NLRC4.

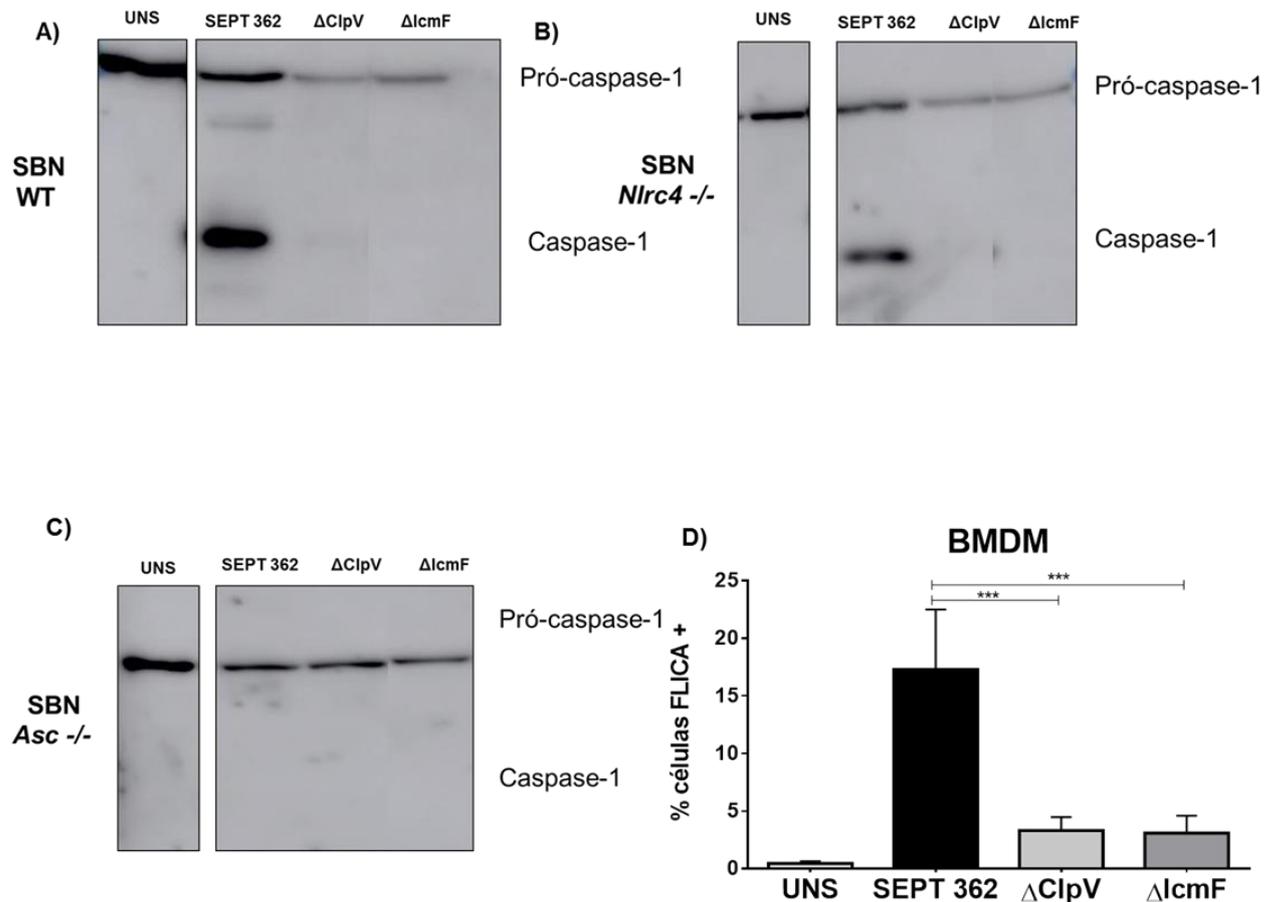


Figura 10 – Infecção por SEPT 362 induz ativação e auto proteólise de caspase 1 em macrófagos.

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 (A) *Nlr4* -/- (B) e *Asc* -/- (C) foram infectados, MOI 100, com as cepas SEPT 362, Δ CipV e Δ lcmF, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40 μ g/mL e gentamicina e as células permaneceram em cultura por mais 1 hora. Após esse tempo os sobrenadantes foram coletados para e os níveis da subunidade p20 de caspase1 foram avaliados por *western blot*. BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 foram infectados, MOI 100, com as cepas SEPT 362, Δ CipV e Δ lcmF, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 50 μ g/mL e gentamicina e as células permaneceram em cultura por mais 1 hora. Após esse tempo as células foram incubadas com a sonda FAM-YVAD-FLICA (D) por 1 hora à 37°C, terminada a incubação as células foram desaderidas e preparadas para aquisição imediata no citômetro de fluxo. Os dados em são representativos de três experimentos independentes. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.6 A secreção de IL-1 β induzida por SEPT 362 é parcialmente dependente de caspase 1 e 11 e do receptor NLRP3 *in vitro*.

Anteriormente verificamos que a indução da secreção de IL-1 β por SEPT 362 é influenciada pelo SST6 (Fig 9), indicando a ativação do inflamassoma durante a infecção com *E. coli*. Analisamos então se esse processamento e secreção seriam dependentes da ativação das caspases 1 e 11 assim como de NLRP3 através da infecção de BMDMs provenientes de animais *Caspase1-11* *-/-* e *Nlrp3* *-/-* (Fig 11). Verificamos uma redução significativa nos níveis de IL-1 β em macrófagos provenientes de animais *Caspase1-11* *-/-* e *Nlrp3* *-/-* quando comparados a células selvagens infectadas com SEPT 362. Este dado indica que a secreção de IL-1 β induzida por SEPT 362 é parcialmente dependente de caspase 1 e 11 e do receptor NLRP3 *in vitro*. Futuramente, para um melhor aprofundamento da contribuição individual dessas caspases na clivagem de IL-1 β a infecção em células provenientes de camundongos *caspase 1* *-/-* e *caspase 11* *-/-* deverá ser realizada.

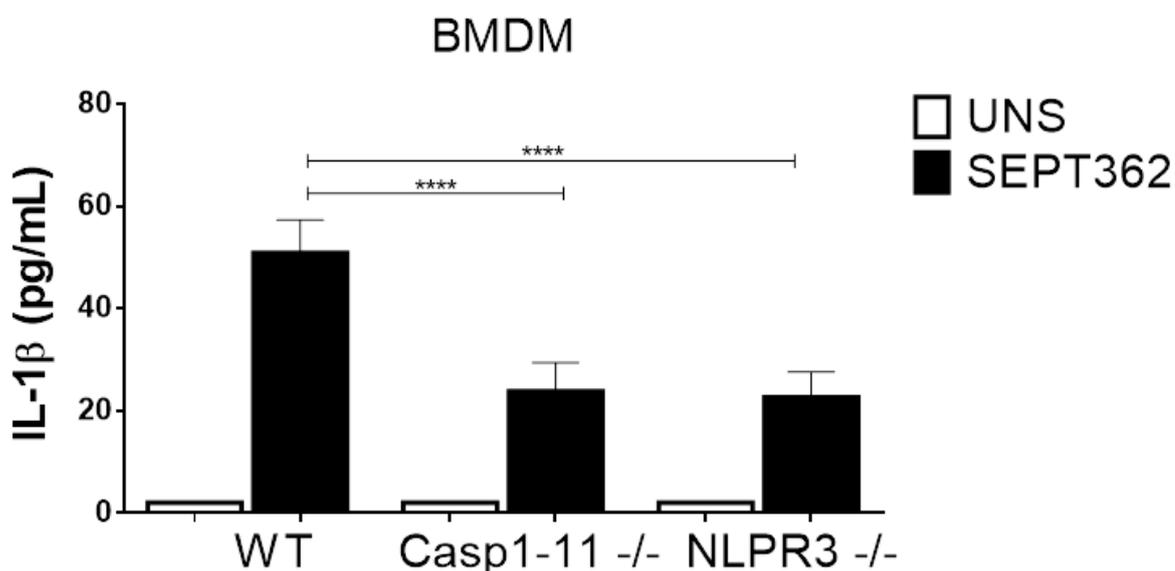


Figura 11 – SEPT 362 induz a secreção de IL-1 β de forma dependente de caspases 1 e 11 e Nlrp3.

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 *Caspase 1-11* *-/-* e *Nlrp3* *-/-* foram infectados, MOI 100, com SEPT 36, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40 μ g/mL e gentamicina e as células permaneceram em cultura por mais 24 horas. Após esse tempo os sobrenadantes foram coletados para dosagem da citocinas IL-1 β . Os dados em são

representativos de três experimentos independentes. As dosagem foram realizadas pelo método ELISA e os dados de absorbância obtidos no software através do aparelho SpectraMax. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.7 SEPT 362 induz a clivagem de caspase 1 em camundongos infectados de forma parcialmente dependente de lcmF e independente de NLRP3.

Afim de verificar se a infecção por *E. coli* também induziria a clivagem de caspase1 *in vivo*, infectamos animais WT e *Nlrp3*^{-/-} e com as proteínas extraídas a partir das células do lavado peritoneal, a clivagem de caspase1 foi novamente analisada por *western blot*.

A infecção com a cepa SEPT 362 foi capaz de induzir uma maior clivagem de caspase1 em animais WT quando comparada a infecção com Δ lcmF (Fig 12 A). Sabe-se que a clivagem de caspase1 também pode ocorrer através da ativação da via não canônica do inflamassoma onde a caspase11 participa do processo de ativação da caspase1 de forma independente da família NLR (BROZ, Petr e MONACK, 2013). Verificamos que a secreção de IL-1 β induzida por SEPT 362 é dependente de NLRP3 e portanto, fomos investigar se a clivagem de caspase1 também seria dependente da ativação desse inflamassoma. Porém a infecção com SEPT 362 em animais *Nlrp3*^{-/-} também induziu a clivagem de caspase1 (Fig 12 B). Este dado indica que SEPT 362 induz a clivagem de caspase 1 em camundongos infectados de forma parcialmente dependente de lcmF e independente de NLRP3.

Células Lavado peritoneal
In vivo

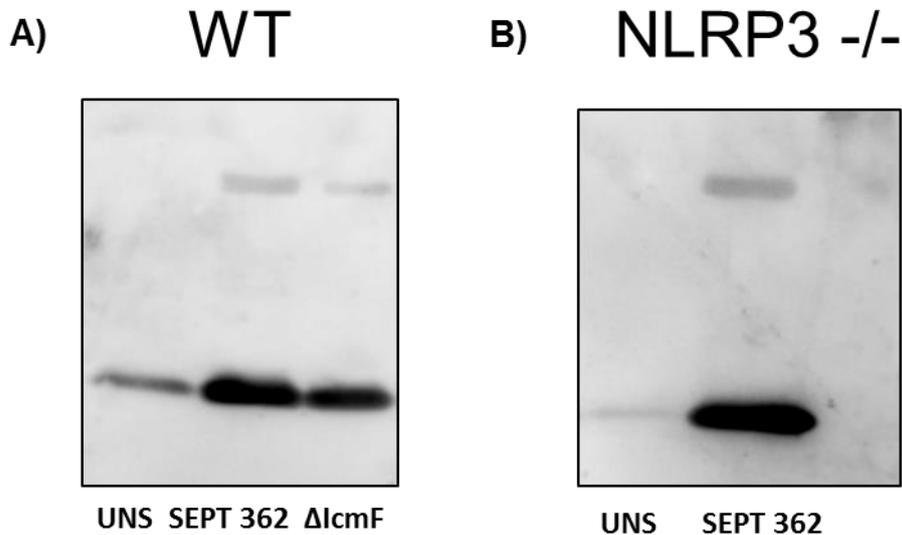


Figura 12 - Clivagem de caspase1 in vivo a partir de infecção com SEPT 362

Camundongos C57BL/6 foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10^7 das cepas as cepas SEPT 362 e Δ lcmF (A) e camundongos *Nlrp3*^{-/-} (B) foram infectados com SEPT 362 e mantidos por 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS. Após o tempo de estímulo foi realizado um lavado peritoneal onde as células coletadas tiveram os níveis da subunidade p20 de caspase1 avaliados por *western blot*.

4.8 Proteínas relacionadas à ativação do inflamassoma exercem diferentes papéis na capacidade microbicida de macrófagos infectados com SEPT 362 bem como na colonização do baço e fígado de camundongos infectados.

Já que provamos um envolvimento das caspases 1 e 11 e do inflamassoma NLRP3 para a secreção de IL-1 β induzida por SEPT 362 e que o SST6 está diretamente relacionado com a capacidade de replicação intracelular em macrófagos de *E. coli* investigamos se a ativação do inflamassoma poderia reduzir esse potencial replicativo, e encontramos que há sim uma redução dependente de caspases 1 e 11 e Nlrp3. A ativação de caspase 1 é fundamental para resistência a infecção por *Francisella*, onde animais *Caspase 1*^{-/-} sucumbiram mais rapidamente a infecção e apresentaram uma maior carga bacteriana no fígado e baço

(MARIATHASAN e colab., 2005). Nesse trabalho mostramos que a capacidade de replicação intracelular bacteriana, bem como a colonização do baço e fígado de animais infectados com SEPT 362 é dependente do SST6 (Fig 8). Posteriormente avaliamos se a ausência das caspases 1 e 11, bem como de Nlrp3, poderiam modificar a capacidade de resistência a infecção com *E. coli*. Em BMDM, verificamos que as bactérias conseguem ter uma replicação intracelular mais eficiente em macrófagos *caspase 1-11 -/-* e *Nlrp3-/-* (Fig 13 A), quando comparada aos macrófagos selvagens.

Camundongos *caspase 1-11 -/-* apresentaram uma maior colonização bacteriana do baço (Fig 13 B) quando comparados aos animais selvagens. O aumento da colonização bacteriana do fígado foi maior tanto em animais *caspase 1-11 -/-* quanto animais *Nlrp3-/-* (Fig 13 C) quando comparados aos animais selvagens.

Avaliamos ainda se o tempo de infecção influenciaria na colonização desses órgãos nos diferentes animais. Verificamos que em animais selvagens (Fig 14 A, 14 B) e *Nlrp3-/-* (Fig 14E, 14F) temos um maior pico de colonização tanto no baço quanto no fígado nas primeiras 12 horas de infecção. De forma similar, o animal *Caspase 1-11 -/-* também apresentou um pico maior de carga bacteriana no fígado com 12 horas (Fig 14 D) de infecção. Porém no baço, esse pico foi com 24 horas (Fig 14 C) de infecção. Indo de acordo com o que sabemos sobre a rápida ativação da resposta imune inata, percebemos que o pico maior de infecção de SEPT 362 nos 3 modelos animais ocorre durante as primeiras 12 horas havendo uma significativa redução da carga bacteriana ao se passarem 24 horas. O mesmo evento ocorre para o baço no caso de animais WT e *Nlrp3-/-*, curiosamente em animais *caspase 1-11 -/-* a colonização do baço vai aumentando ao longo do tempo.

Nossos dados aprofundam mais o papel de efetores do SST6 na ativação do inflamassoma e o papel crucial das caspases 1 e 11 nesse processo como também para restrição da replicação bacteriana *in vivo*, porém é necessário ainda que esses mecanismos sejam melhores elucidados, principalmente a respeito do papel do NLRP3 nessa via.

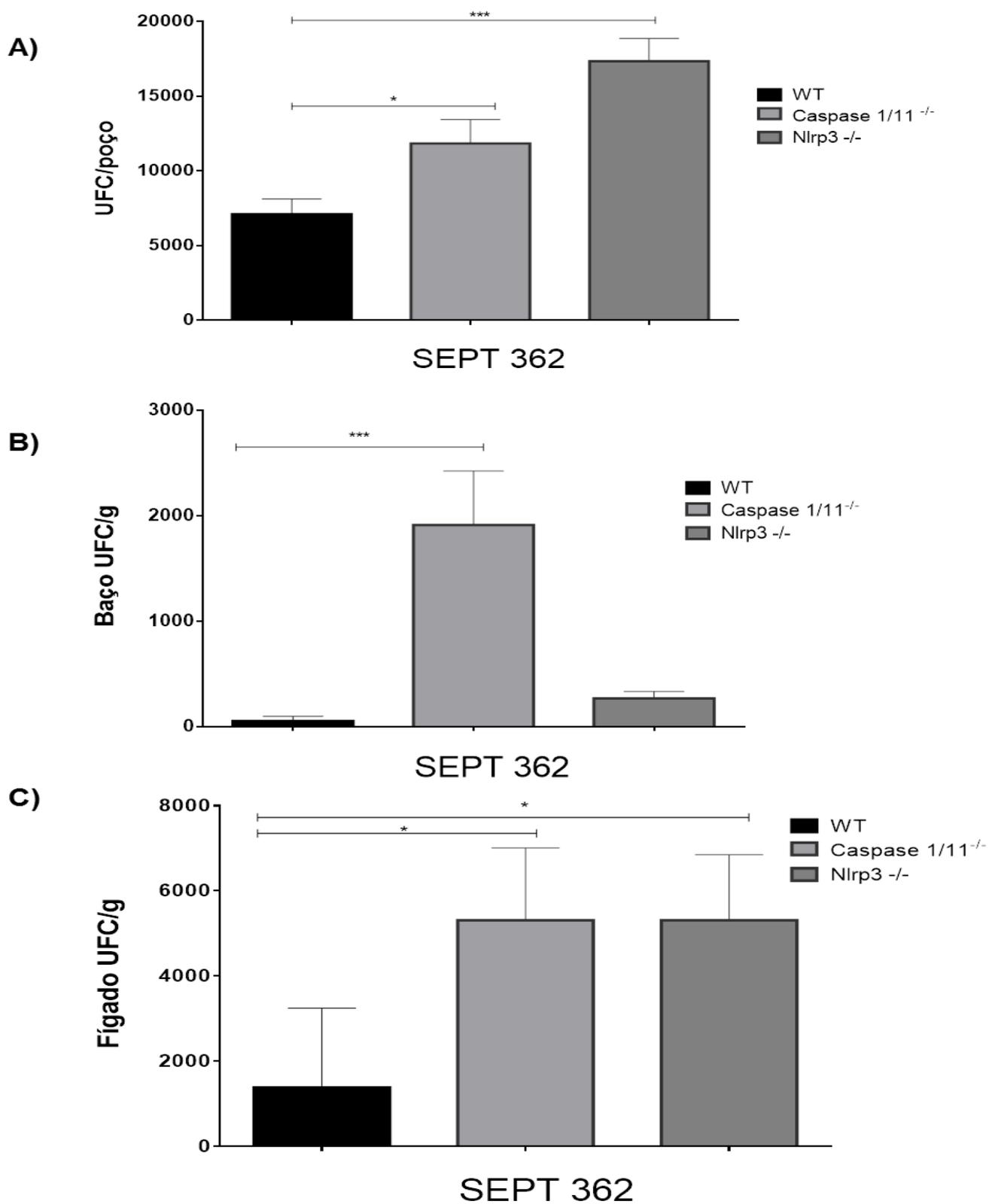


Figura 13 - O papel do inflamassoma NLRP3 e das caspases 1 e 11 durante a replicação intracelular de SEPT 362 e a colonização do fígado e baço.

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6, *Caspase 1-11* *-/-* e *Nlrp3* *-/-* foram infectados, MOI 100, com s SEPT 362, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40µg/mL de gentamicina e as células permaneceram em cultura. Após 6 horas os macrófagos foram lisados com triton e as bactérias internalizadas foram plaqueadas em diluições seriadas e colocadas em estufa a 37°C *overnight* para determinação de UFC (A). Camundongos C57BL/6, *Caspase 1-11* *-/-* e *Nlrp3* *-/-* foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10⁷ de SEPT 362 e mantidos por 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS. Ao término do estímulo os animais foram sacrificados para retirada de órgãos. Homogenatos do baço (B) e do fígado (C) foram diluídos e plaqueados em MacKonkey-ágar e mantidos na estufa *overnight*. As unidades formadoras de colônia foram determinadas levando em consideração o peso do órgão de cada animal e para melhor representação gráfica todos os valores de UFC foram divididos por 10. Os dados em são representativos de três experimentos independentes em A e de dois experimentos em C. Asteriscos representam diferenças significativas onde p<0,05.

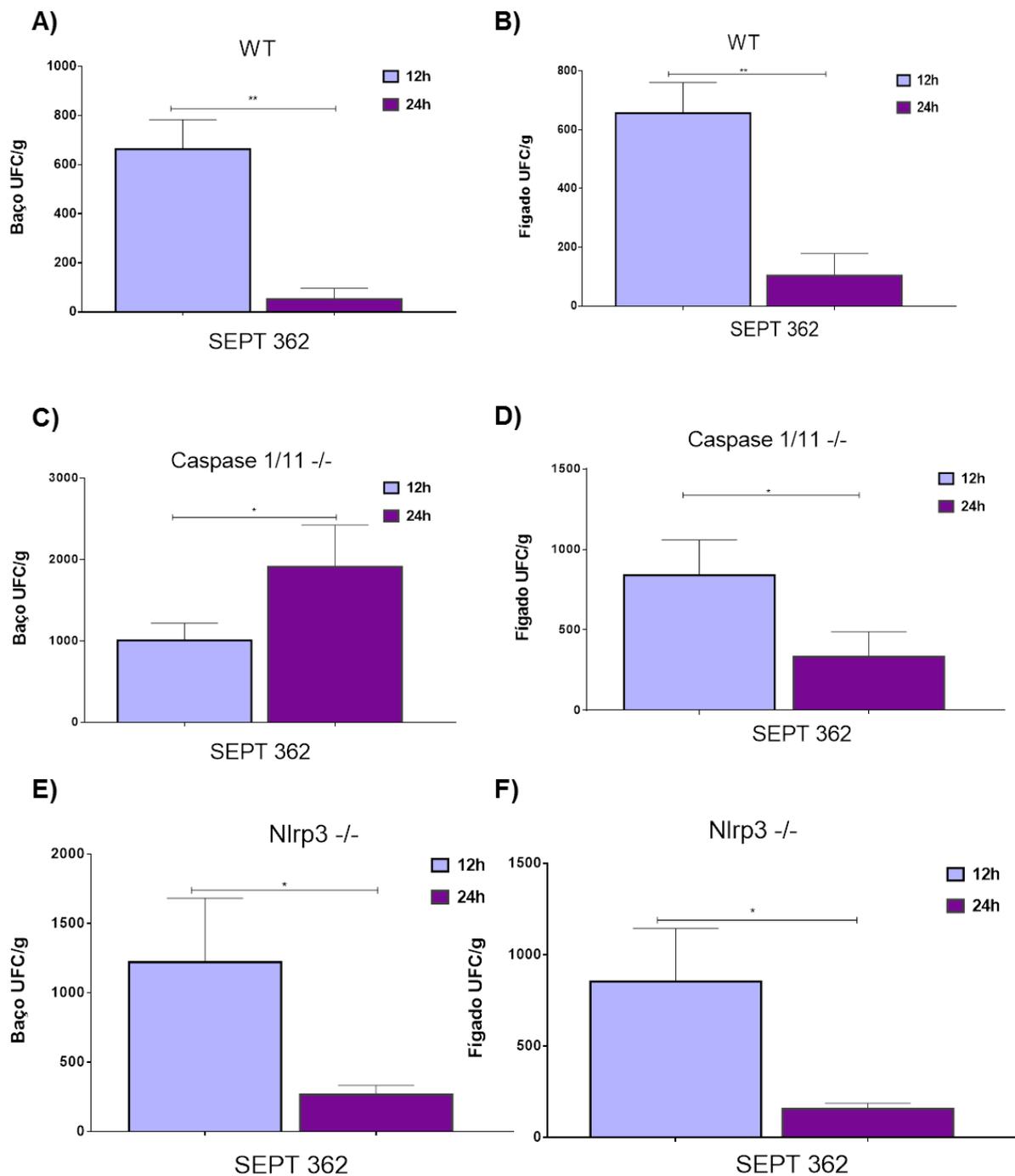


Figura 14 - O papel do inflamassoma Nlrp3 e das caspases 1 e 11 na colonização do baço e fígado por SEPT 362 em diferentes tempos.

Camundongos C57BL/6 (A e B), *Caspase 1-11* $-/-$ (C e D) e *Nlrp3* $-/-$ (E e F) foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10^7 de SEPT 362 e mantidos por 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS. Ao término do estímulo os animais foram sacrificados para retirada de órgãos. Homogenatos do baço (A,C e E) e do fígado (B,D e F) foram diluídos e plaqueados em MacKonkey-ágar e mantidos na estufa *overnight*. As unidades formadoras de colônia foram determinadas levando em consideração o peso do órgão de cada animal e para melhor representação gráfica todos os valores de UFC foram divididos por 10. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.9 A indução de NO bem como de ROS por SEPT 362 é alterada na ausência das caspases 1 e 11 e do receptor NLRP3.

Atualmente sabe-se que além da clivagem de caspase1 e secreção de IL-1 β e IL-18, outros mecanismos efetores são acionados como a indução de atividade microbicida ou até mesmo ativação da resposta imune adaptativa a partir dos inflamassomas (LAGE e colab., 2014). No que tange a mecanismos de ação microbicida, identificamos a liberação de óxido nítrico por macrófagos é influenciada pela presença de um SST6 funcional.

Como o papel do SST6 na produção de NO já estabelecido (Fig 7A), verificamos ainda que a secreção de NO frente à infecção por SEPT 362 em BMDM é diminuída na ausência das caspases 1 e 11 bem com de Nlrp3 (Fig 15 A). No que diz respeito à produção de ROS, encontramos que a infecção em animais *knockouts* apresentou um efeito completamente oposto ao encontrado em animais WT, induzindo um grande aumento na geração de ROS (Fig 15 B,C). Lima-Junior e colaboradores mostraram que a secreção de IL-1 β por meio ativação do inflamassoma NLRP3 são suficientes para induzires a produção de NO através da sinalização do receptor IL-1 e MyD88 em resposta a infecção com *Leishmania* (LIMA-JUNIOR e colab., 2013). O trabalho de Buzzo e colaboradores verificou que macrófagos provenientes de camundongos *caspase 1-11 -/-* não apresentam nenhum defeito intrínseco para a produção de NO, entretanto esse trabalho mostrou a caspase1 contribui para regulação epigenética da enzima NOS2 de forma que a ativação do inflamassoma NLRC4 pela flagelina de *Salmonella typhimurium* participa da regulação da produção de NO em macrófagos(BUZZO e colab., 2017). Sendo assim nossos achados de que a infecção por SEPT 362 em macrófagos *caspase 1-11 -/-* e *Nlrp3-/-* tem uma menor produção de NO estão indo de acordo com os novos mecanismos propostos onde a ativação do inflamassoma contribui diretamente para essa regulação na produção de NO. A descoberta que a infecção por SEPT 362 foi capaz de diminuir a geração de ROS foi contrária ao esperado, e devido a dependência das proteínas ClpV e IcmF a primeira hipótese que nos ocorreu foi o estabelecimento de um mecanismo de escape dependente do SST6. Entretanto já foi demonstrado que durante a infecção por *Staphylococcal* que a

indução da produção de NO acaba por inibir a geração de ROS (KAPLAN e colab., 1996). A percepção de que na ausência de componentes do inflamassoma a indução de ROS por SEPT 362 era muito maior juntamente com a análise de que a ativação do inflamassoma por *E. coli* está diretamente envolvido na indução de NO, nos levou a proposição que esses mecanismos podem estar atuando de forma conjunta. Durante a infecção de animais WT a produção de NO, dependente da ativação do inflamassoma, estaria reduzindo a geração de ROS, sendo assim durante a infecção de *caspase 1-11 -/-* e *Nlrp3*, como a produção de NO estaria baixa o efeito inibitório sobre a geração de ROS não ocorreria.

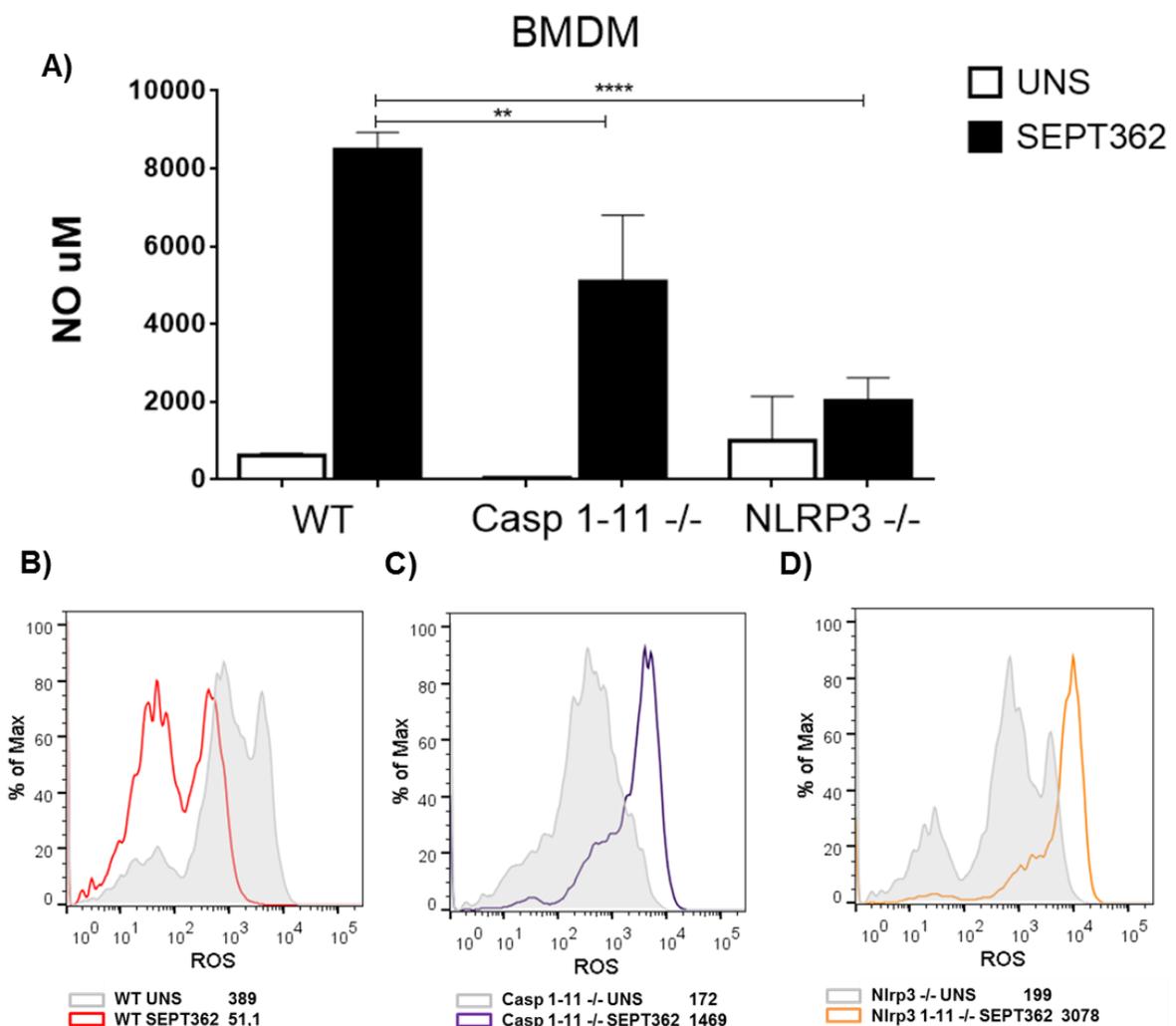


Figura 15 - Influência do inflamassoma na modulação do metabolismo redox por SEPT 362

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 *Caspase 1-11 -/-* e *Nlrp3 -/-* foram infectados, MOI 100, com SEPT 36 , após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 40µg/mL e gentamicina e as células permaneceram em cultura por mais 24 horas, para avaliação dos

níveis de óxido nítrico no sobrenadante (A) . Camundongos C57BL/6 (B), *Caspase 1-11 -/-* (C) e *Nlrp3-/-* (D) foram infectados, através de injeção intraperitoneal, com uma solução contendo 10^7 de SEPT 362 mantidos por 24 horas, como controle um grupo de animais foi estimulado com PBS . Após o tempo de estímulo foi realizado um lavado peritoneal onde as células coletadas foram então incubadas com DFCD4 por 1 hora à 37°C e então preparadas para aquisição imediata no citômetro de fluxo. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.10 O SST6 influencia a modulação da apresentação de antígenos lipídicos

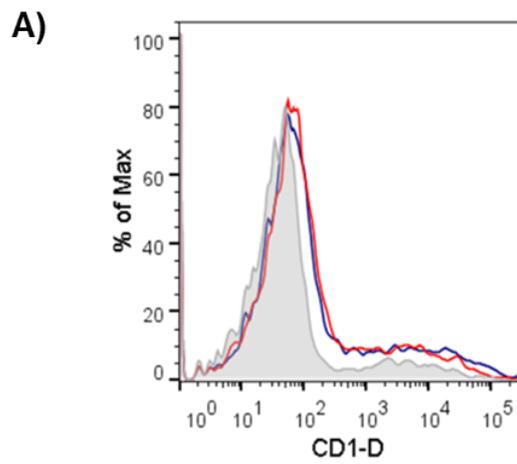
Ao curso da evolução, patógenos desenvolveram variados mecanismos para conseguirem resistir às tentativas de combates do hospedeiro através da evasão da resposta imune. Bactérias usam estratégias que vão desde a evasão do reconhecimento pela superfície de mucosas até interferências durante a resposta imune adaptativa (HORNEF e colab., 2002). A apresentação de antígeno por fagócitos profissionais é um dos principais ganchos de conexão entre a resposta imune inata e a adaptativa e é utilizada como um dos pontos de evasão da resposta imune por várias bactérias como *S. enterica*, *M. tuberculosis* e *Chlamydia trachomatis* (HORNEF e colab., 2002). Várias bactérias e outros patógenos tentam subverter em parte ou completamente essa apresentação, ou até mesmo modula-la a seu favor, entretanto devido à imensa variedade de patógenos os mecanismos pelos quais isso é possível são completamente diversificados. *Yesinia enterocolitica*, por exemplo, utiliza de um efector do SST3 que afeta a via de sinalização MAPK levado a uma menor apresentação de antígenos por células dendríticas (YAKIMCHUK e colab., 2012).

Nesse trabalho investigamos a capacidade de apresentação de antígenos lipídicos através da análise da expressão de moléculas de superfície CD1d em macrófagos infectados com SEPT 362 e suas respectivas mutantes Δ ClpV e Δ IcmF. Observamos que a bactéria SEPT 362 é capaz de induzir a expressão de moléculas CD1d apresentadoras de antígenos lipídicos em BMDMs quando comparadas a células não infectadas (Fig 16 A,B). Entretanto, quando há ausência das proteínas do SST6, especialmente a IcmF, podemos notar que a indução da expressão de CD1d é muito mais elevada (Fig 16 B) se compararmos aos macrófagos infectados

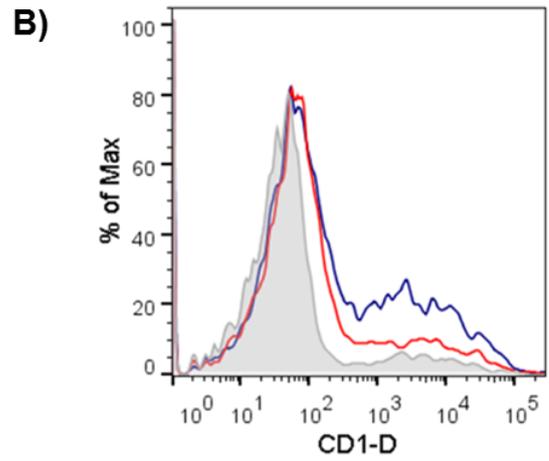
com a bactéria selvagem. Sendo assim o SST6 pode estar envolvido em uma tentativa de escape da apresentação de antígenos lipídicos já que a ausência de algumas de suas proteínas durante a infecção faz com que a expressão de CD1d seja mais alta do que quando comparadas com a cepa selvagem.

Yakimchuk e colaboradores investigaram o papel da secreção de IL-1 β na regulação da expressão de CD1 em células mielóides (YAKIMCHUK e colab., 2012). A partir do relevante papel que as caspases 1 e 11 mostraram para indução do inflamassoma por *E. coli*, e ainda investigando como a ativação desse multicomplexo pode afetar outros domínios da resposta imune, nos perguntamos se a expressão de CD1d seria alterada em camundongos *caspase 1-11* *-/-*. Observamos que na ausência das caspases 1 e 11 temos um aumento da expressão de CD1d em BMDM infectados com SEPT 362 (Fig 16 D) quando comparamos com a infecção em células selvagens. Yakimchuk e colaboradores mostraram que IL-1 β é capaz de modular a expressão do grupo 1 de moléculas CD-1 mas não do grupo 2 (onde CD1d se encontra), aqui nos encontramos que os mecanismos pelos quais o SST6 alteram a expressão de CD1d são independentes das caspases 1 e 11 (YAKIMCHUK e colab., 2012).

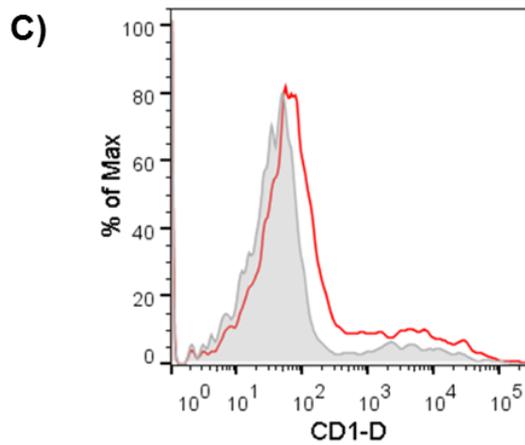
A secreção de IL-12 e a apresentação de antígenos lipídicos via CD1d são fenômenos muitas vezes relacionados (YUE e colab., 2010). Anteriormente verificamos que o SST6 estava envolvido na secreção de IL-12, fomos então averiguar se esse perfil poderia ser alterado na ausência de caspases 1 e 11 e do Nlrp3 e encontramos que na ausência dessas proteínas a infecção por SEPT 362 apresenta menores níveis de IL-12 (Fig 16 E).



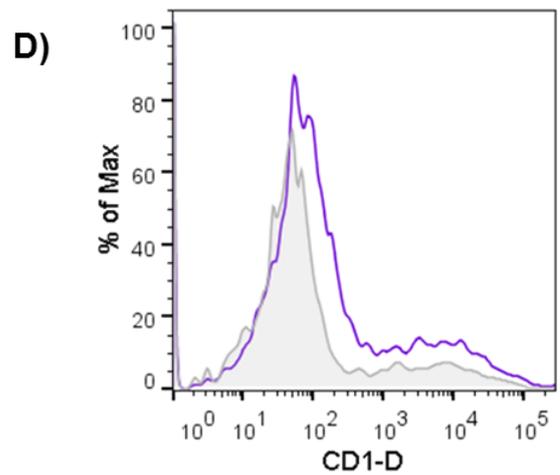
▭ WT UNS	31,9
▭ WT SEPT362	88,3
▭ WT Δ CipV	96,6



▭ WT UNS	31,9
▭ WT SEPT362	88,3
▭ WT Δ cmF	163



▭ WT UNS	31,9
▭ WT SEPT362	88,3



▭ Casp 1-11 -/- UNS	55,8
▭ Casp 1-11 -/- SEPT362	133

E)

BMDM

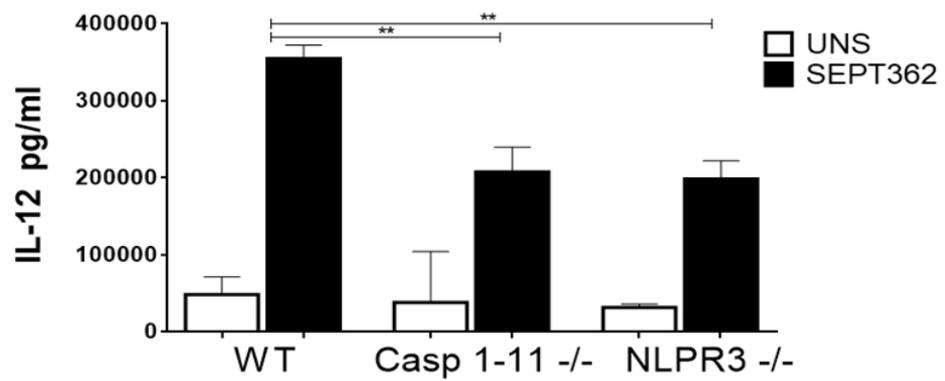


Figura 16 - Influência do SST6 na apresentação de antígenos lipídicos e secreção de IL-12

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 foram infectados com SEPT 362 (A,B e C), Δ ClpV (A), Δ lcmF (B), *Caspase 1-11* $-/-$ foram infectados com SEPT 362 (D e E) e *Nlrp3* $-/-$ com SEPT 362 (E) MOI 100, com SEPT 36, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 50 μ g/mL e gentamicina e as células permaneceram em cultura por mais 24 horas. Após esse tempo os sobrenadantes foram coletados para dosagem da citocinas IL-12 e as células foram preparadas para detecção dos níveis de CD1-d por citometria de fluxo. Os dados em são representativos de três experimentos independentes. As dosagem foram realizadas pelo método ELISA e os dados de absorbância obtidos no software através do aparelho SpectraMax. Asteriscos representam diferenças significativas onde $p < 0,05$.

4.11 Modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos por *E. coli* e os efeitos da inibição da ácido graxo sintase em macrófagos durante a infecção.

Macrófagos infectados com SEPT 362 e as cepas Δ ClpV, e Δ lcmF foram analisados quanto a biogênese de corpúsculos lipídicos e verificamos que a infecção com SEPT 362 reduz a biogênese quando comparada com células não estimuladas e essa redução é independente das proteínas ClpV e lcmF (Fig 17).

Em continuidade ao aspecto da relação do inflamassoma com outras vias durante a infecção nos perguntamos se a biogênese de CLs seria alterada em camundongos *knockouts*, já que essas organelas estão fortemente associadas a infecções bacterianas (HERKER e OTT, 2012). Quando avaliamos como a infecção por SEPT 362 se comportava em macrófagos *Caspase 1/11* $-/-$, observamos um aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos, ao contrário do encontrado em WT e *Nlrp3* $-/-$.

A biogênese de CLs é um processo multifatorial que leva o envolvimento de várias moléculas e a intersecção de vários mecanismos intracelulares, sendo que alguns deles são diretamente controlados a partir do fator de transcrição PPAR γ (BOZZA e ALMEIDA e colab., 2009). Dados prévios do nosso grupo mostram que a infecção com SEPT 362 é capaz de modular os níveis de PPAR γ (Dados não

publicados), e a enzima ácido graxo sintase é uma das moléculas que são reguladas por esse fator de transcrição. Afim de melhor investigar os mecanismos envolvidos na modulação do metabolismo lipídico durante a infecção com *E. coli* tratamos BMDMs com 1 μ M de C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase que consequentemente pode diminuir a biogênese de corpúsculos lipídicos, e avaliamos a biogênese destas organelas assim como a capacidade de replicação intracelular de SEPT 362. Observamos que a inibição da enzima ácido graxo sintase não interfere na diminuição de CLs por SEPT 362 e Δ ClpV, porém acentua esse efeito quando se trata de Δ IcmF(Fig 18). Ao inibirmos farmacologicamente essa enzima esperávamos averiguar se a diminuição da biogênese de CLs por SEPT 362 poderia estar associada a ela. Apesar de esperarmos que o tratamento com C75 causasse um certo sinergismo em relação a diminuição de CLs o que entramos é que durante a infecção com SEPT 362 a inibição da ácido graxo sintase não alterou o padrão de diminuição da biogênese. Curiosamente, apesar do tratamento com C75 não alterar a modulação da biogênese durante a infecção com Δ ClpV, essa inibição diminuiu ainda mais a biogênese de CLs quando os macrófagos eram infectados com Δ IcmF. Mostramos pela primeira vez uma correlação entre o complexo inflamassoma e a biogênese de CLs durante uma infecção com *E. coli*, entretanto ainda precisamos investigar de forma mais detalhada os mecanismos que permeiam essa conexão, bem como os efeitos da inibição de ácido graxo sintase durante a infecção por Δ IcmF.

Considerando que na ausência de caspases 1 e 11 observamos um aumento de corpúsculos lipídicos, avaliamos ainda se o tratamento com C75 poderia afetar a capacidade microbicida de macrófagos infectados. Verificamos que ao inibir a ácido graxo sintase houve uma diminuição no potencial de replicação de SEPT 362 ou aumento da capacidade microbicida de macrófagos *caspase 1/11 -/-*, o que não foi observado em macrófagos *Nlrp3-/-* (Fig 19). Mostrando que apesar de não estar diretamente relacionada a biogênese de CLs, está vinculada ao metabolismo de moléculas ligadas ao complexo do inflamassoma.

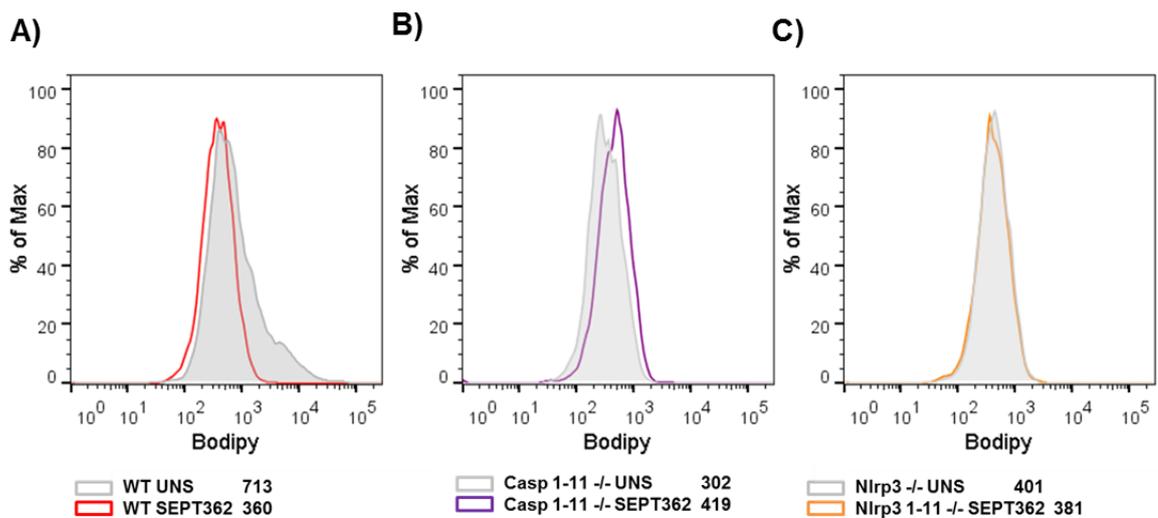


Figura 17 - Papel do inflamassoma durante a biogênese de CL em macrófagos infectados com SEPT 362.

BMDMs proveniente de camundongos C57 BL/6 (A) *Caspase 1-11 -/-* (B) e *Nlrp3 -/-* (C) foram infectados, MOI 100, com SEPT 36, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 50µg/mL e gentamicina e as células permaneceram em cultura por mais 24 horas. Ao final dos estímulos, os macrófagos foram incubados com uma sonda lipofílica para avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo.

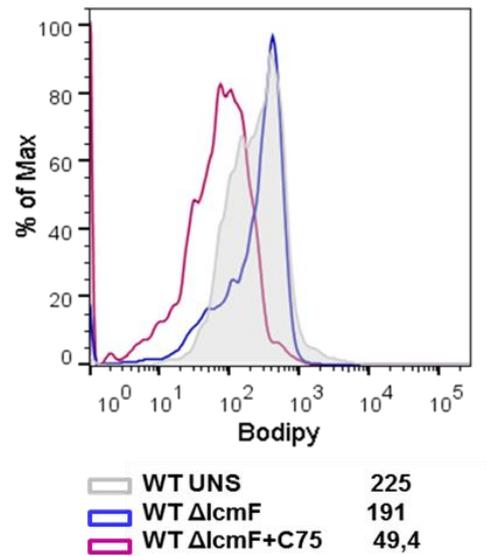
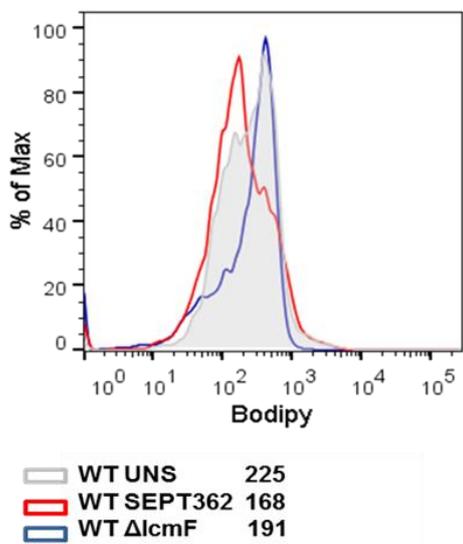
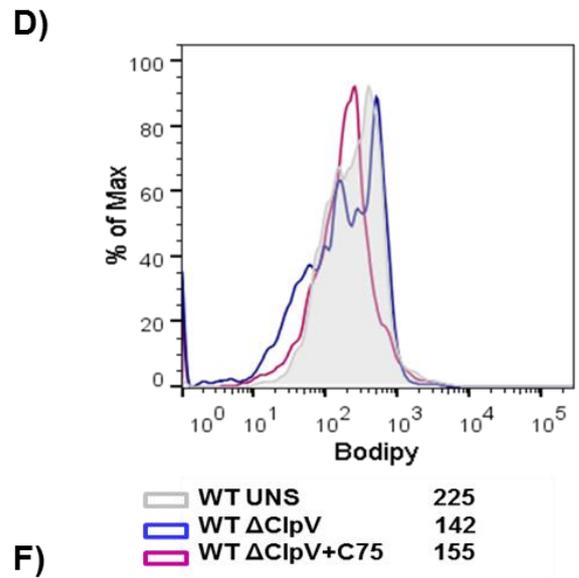
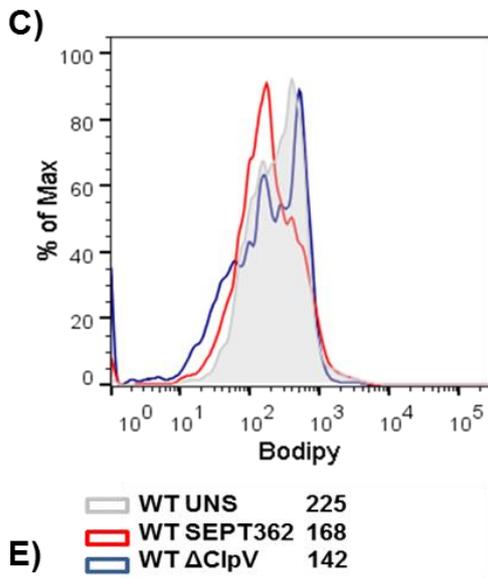
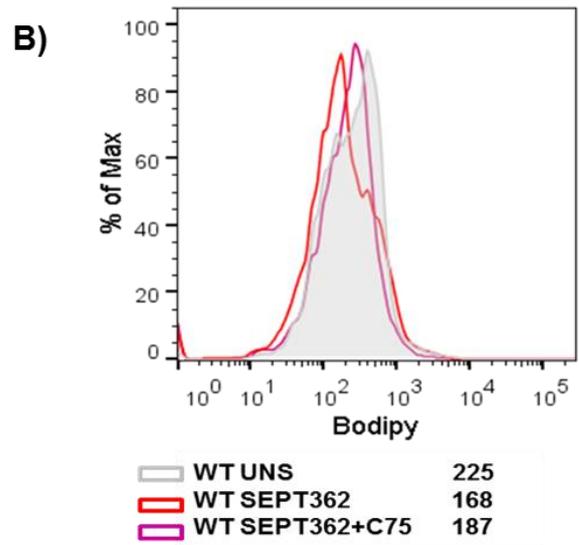
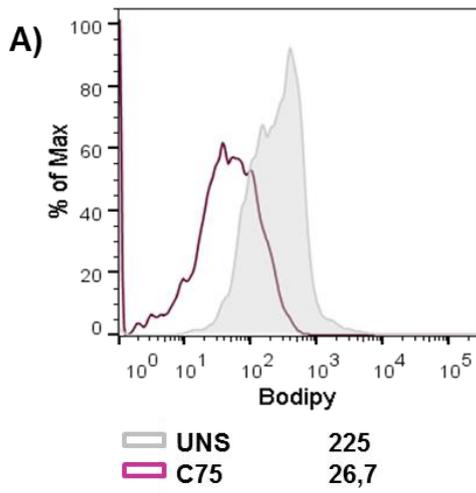


Figura 18 - Efeitos da inibição da ácido graxo sintase durante a biogênese de CL ao longo da infecção com *E. coli*

BMDMs provenientes de C57BL/6 foram pré tratados com 1 μ M de C75 por 1 hora prévia a infecção (A, B, D e F) e então foram infectados, MOI 100, com as cepas SEPT 362 (B, C e E), Δ ClpV (C e D) e Δ lcmF (E e F), após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 50 μ g/mL de gentamicina e as células permaneceram em cultura por 24h. . Ao final dos estímulos, os macrófagos foram incubados com uma sonda lipofílica para avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo.

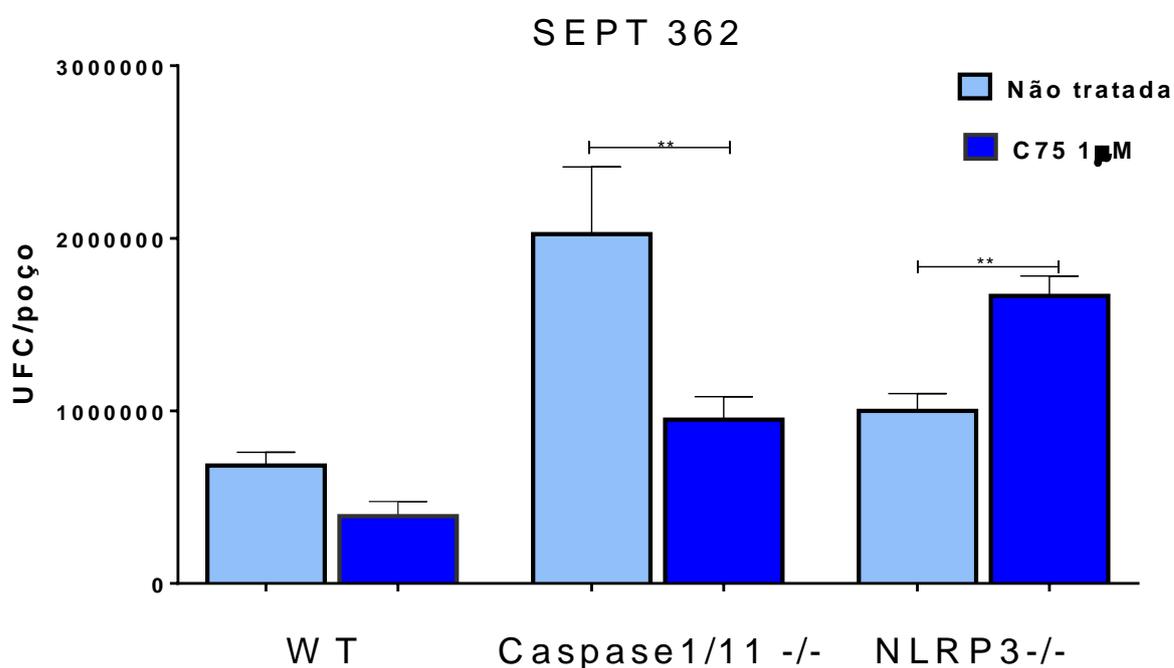


Figura 19 - Inibição da ácido graxo sintase altera a capacidade microbicida de macrófagos *Caspase 1-11 -/-* e *Nlrp3-/-*

BMDMs provenientes de C57BL/6, *Caspase 1-11 -/-* e *Nlrp3-/-* foram pré tratados com 1 μ M de C75 por 1 hora prévia a infecção e foram infectados, MOI 100, com SEPT 362, após 2 horas de interação entre bactérias e macrófagos, para permitir a fagocitose, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio contendo 50 μ g/mL de gentamicina e as células permaneceram em cultura. Após 6 horas os macrófagos foram lisados com triton e as bactérias internalizadas foram plaqueadas em diluições seriadas e colocadas em estufa a 37 $^{\circ}$ C *overnight* para determinação de UFC.

6. Conclusão

No trabalho apresentado mostramos que a presença de proteínas cruciais do SST6, ClpV e IcmF influenciam a capacidade de *E. coli* induzir uma resposta microbicida mais exacerbada em macrófagos. Essas proteínas desenvolvem ainda um papel fundamental durante a replicação intracelular de *E. coli*. Apresentamos resultados que evidenciam a relação do SST6 com a ativação de vias relacionadas ao complexo do inflamassoma durante a infecção com *E. coli* SEPT 362. Nesse aspecto, a presença das caspases 1 e 11 e do receptor NLRP3 participam não só para a ativação do inflamassoma como também para o funcionamento de outros mecanismos celulares induzidos durante a infecção. Por fim analisamos que a modulação da biogênese de CLs durante a infecção por *E. coli* tem influência de componentes do inflamassoma porém não é dependente do SST6 e a enzima ácido graxo sintase altera a replicação intracelular de *E. coli* também de forma dependente do inflamassoma. De forma conjunta esses resultados evidenciam a relação do SST6 como um mecanismo de patogenicidade capaz de influenciar a ativação do inflamassoma que acaba por interferir de vários aspectos da resposta imune inata.

7.Referências Bibliográficas

ALCOFORADO DINIZ, Juliana e LIU, Yi Chia e COULTHURST, Sarah J. **Molecular weaponry: Diverse effectors delivered by the Type VI secretion system**. Cellular Microbiology. [S.l: s.n.], 2015

AUBERT, Daniel F. e colab. **A Burkholderia Type VI Effector Deamidates Rho GTPases to Activate the Pyrin Inflammasome and Trigger Inflammation**. Cell Host and Microbe, v. 19, n. 5, p. 664–674, 2016.

BASLER, Marek. **Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine**. 2015.

BASTIANI, Michele e VIDOTTO, Marilda Carlos e HORN, Fabiana. **An avian pathogenic Escherichia coli isolate induces caspase 3/7 activation in J774 macrophages**. FEMS Microbiology Letters, v. 253, n. 1, p. 133–140, 2005.

BAUERNFEIND, Franz G e colab. **Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression**. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 183, n. 2, p. 787–91, 2009.

BERGSBAKEN, Tessa e FINK, Susan L e COOKSON, Brad T. **Pyroptosis: host cell death and inflammation**. Nature reviews. Microbiology, v. 7, n. 2, p. 99–109, 2009.

Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2910423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BHAVSAR, Amit P e GUTTMAN, Julian a e FINLAY, B Brett. **Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens**. Nature, v. 449, n. 7164, p. 827–834, 2007.

BINGLE, L E e BAILEY, C M e PALLEN, M J. **Type VI secretion: a beginner's guide**. Current Opinion in Microbiology, v. 11, n. 1, p. 3–8, 2008.

BOZZA, Patricia T e ALMEIDA, Patricia E e colab. **Lipid droplets in host – pathogen interactions**. v. 4299, n. February, p. 791–807, 2009.

BOZZA, Patricia T. e MAGALHÃES, Kelly G. e WELLER, Peter F. **Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation**. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. [S.l: s.n.], 2009

BRODSKY, Igor E. e colab. **A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system.** Cell Host and Microbe, v. 7, n. 5, p. 376–387, 2010.

BROZ, Peter e colab. **Caspase11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase1.** v. 490, n. 7419, p. 288–291, 2013.

BROZ, Petr e colab. **Differential requirement for caspase1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing.** Cell Host and Microbe, v. 8, n. 6, p. 471–483, 2010.

BROZ, Petr e DIXIT, Vishva M. **Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling.** Nature Reviews Immunology, v. 16, n. 7, p. 407–420, 2016..

BROZ, Petr e MONACK, Denise M. **Noncanonical Inflammasomes: Caspase11 Activation and Effector Mechanisms.** PLoS Pathogens, v. 9, n. 2, p. 9–12, 2013.

BUZZO, Carina de Lima e colab. **Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage.** Scientific Reports, v. 7, n. February, p. 41686, 2017.

CALICH, Vera; **Imunologia.** Segunda ed. [S.l: s.n.], 2009.

COSTA, Tiago R. D. e colab. **Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights.** Nature Reviews Microbiology, v. 13, n. 6, p. 343–359, 2015.

CROXEN, Matthew a e FINLAY, B Brett. **Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity.** Nature reviews. Microbiology, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.

DAS, Soumita e colab. **Involvement of in vivo induced icmF gene of Vibrio cholerae in motility, adherence to epithelial cells, and conjugation frequency.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 295, n. 4, p. 922–928, 2002.

DE PACE, F e colab. **The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic Escherichia coli strain.** Infect Immun, v. 78, n. 12, p. 4990–4998, 2010.

DE PACE, Fernanda e colab. **Characterization of icmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strain.** Microbiology, v. 157, n. 10, p. 2954–2962, 2011.

DONG, Tao G e colab. **Generation of reactive oxygen species by lethal attacks**

from competing microbes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 112, n. 7, p. 2181–2186, 2015.

DOUZI, Badreddine e colab. **Structure and specificity of the Type VI secretion system ClpV-TssC interaction in enteroaggregative Escherichia coli.** Nature Publishing Group, n. October, p. 1–13, 2016.

FIGUEIRA, Rita e colab. **Identification of Salmonella pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of S. enterica serovar typhimurium: Implications for rational vaccine design.** mBio, v. 4, n. 2, 2013.

FRANCHI, L e colab. **Cytosolic flagellin requires IpaF for activation of caspase1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages.** Nat Immunol, v. 7, n. 6, p. 576–582, 2006.

GERLACH, Roman G. e HENSEL, Michael. **Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens.** International Journal of Medical Microbiology, v. 297, n. 6, p. 401–415, 2007.

GREEN, Erin R e MECSAS, Joan. **Bacterial Secretion Systems : An Overview.** n. May, p. 1–19, 2016.

GUO, Haitao e CALLAWAY, Justin B e TING, Jenny P-Y. **Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics.** Nat Med, v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015.

HAYES, C S e AOKI, S K e LOW, D A. **Bacterial contact-dependent delivery systems.** Annu Rev Genet, v. 44, p. 71–90, 2010.

HERKER, Eva e OTT, Melanie. **Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions.** Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 4, p. 2280–2287, 2012.

HORNEF, M W e colab. **Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses.** Nat Immunol, v. 3, n. 11, p. 1033–1040, 2002.

KAPER, James B. **Pathogenic Escherichia coli.** International Journal of Medical Microbiology, v. 295, n. 6–7, p. 355–356, 2005.

KAPLAN, S. S. e colab. **Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide.** Infection and Immunity, v. 64, n. 1, p. 69–76, 1996.

KAYAGAKI, N e colab. **Caspase11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling.** Nature, v. 526, n. 7575, p. 666–671, 2015.

KAYAGAKI, Nobuhiko e colab. **Non-canonical inflammasome activation targets caspase11**. *Nature*, v. 479, n. 7371, p. 117–121, 2011.

KE, Yuehua e colab. **Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors**. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 5, n. October, p. 72, 2015.

LAGE, Silvia Lucena e colab. **Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes**. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. JUL, p. 1–10, 2014.

LIMA-JUNIOR, Djalma S e colab. **Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania***. *Nature medicine*, v. 19, n. 7, p. 909–15, 2013.

MA, Lay Sun e NARBERHAUS, Franz e LAI, Erh Min. **IcmF family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 19, p. 15610–15621, 2012.

MACINTYRE, Dana L e colab. **The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 107, n. 45, p. 19520–4, 2010.

MARIATHASAN, S e colab. **Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase1 axis**. *J Exp Med*, v. 202, n. 8, p. 1043–1049, 2005.

MARIATHASAN, S e MONACK, D M. **Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation**. *Nat Rev Immunol*, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2007.

MARIM, Fernanda M. e colab. **A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells**. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. 1–8, 2010.

MARTINON, Fabio e BURNS, Kimberly e TSCHOPP, Jürg. **The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β** . *Molecular Cell*, v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002.

MEDZHITOV, R. e JANEWAY, C. A. **On the semantics of immune recognition**. *Research in Immunology*, v. 147, n. 4, p. 208–214, 1996.

MOGENSEN, Trine H. **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.

- MOUGOUS, Joseph D. e colab. **A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus.** *Science*, v. 312, n. 5779, p. 1526–1530, 2006.
- MULDER, David T e COOPER, Colin a e COOMBES, Brian K. **Type VI Secretion System Associated Gene Clusters Contribute to Pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.** *Infection and immunity*, v. 80, n. 6, 2012.
- MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway.** [S.l: s.n.], 2014.
- NATALE, Paolo e BRÜSER, Thomas e DRIESSEN, Arnold J M. **Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. [S.l: s.n.], 2008
- PITOUT, Johann D D. **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance.** *Frontiers in Microbiology*, v. 3, n. JAN, p. 1–7, 2012.
- PUKATZKI, S. e colab. **Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 5, p. 1528–1533, 2006.
- PUKATZKI, Stefan e colab. **Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 39, p. 15508–15513, 2007.
- RATNER, Dmitry e ORNING, M Pontus A e LIEN, Egil. **Bacterial secretion systems and regulation of inflammasome activation.** v. 101, n. January, p. 1–18, 2017.
- RÊGO, Ana Toste e CHANDRAN, Vidya e WAKSMAN, Gabriel. **Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis.** *Biochemical Journal*, v. 425, n. 3, p. 475–488, 2010.
- RODRÍGUEZ, Juan Miguel e colab. **The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life.** *Microbial ecology in health and disease*, v. 26, p. 26050, 2015.
- RUSSELL, Alistair B e PETERSON, S Brook e MOUGOUS, Joseph D. **Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose.** *Nature reviews. Microbiology*, v. 12, n. 2, p. 137–48, 2014.

RUSSO, Thomas A e JOHNSON, James R. **Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of Escherichia coli: ExPEC.** The Journal of Infectious Diseases, v. 181, p. 1753–4, 2000.

SCHWARZ, Sandra e colab. **Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions.** PLoS pathogens, v. 6, n. 8, p. e1001068, 2010.

SILVEIRA, Tatiana N. e ZAMBONI, Dario S. **Pore formation triggered by Legionella spp. is an Nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis.** Infection and Immunity, v. 78, n. 3, p. 1403–1413, 2010.

STOREK, Kelly M. e MONACK, Denise M. **Bacterial recognition pathways that lead to inflammasome activation.** Immunological Reviews. [S.l: s.n.], , 2015

SUZUKI, Toshihiko e colab. **Differential regulation of caspase1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages.** PLoS Pathogens, v. 3, n. 8, p. 1082–1091, 2007.

TIVENDALE, Kelly A. e colab. **Avian-pathogenic Escherichia coli strains are similar to neonatal meningitis E. coli strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease.** Infection and Immunity, v. 78, n. 8, p. 3412–3419, 2010.

WALSH, John G e MURUVE, Daniel A e POWER, Christopher. **Inflammasomes in the CNS.** Nature Publishing Group, v. 15, n. February, p. 1–14, 2014.

WEBER, Brent S. e colab. **Genomic and Functional Analysis of the Type VI Secretion System in Acinetobacter.** PLoS ONE, v. 8, n. 1, 2013.

WEBER, Mary M. e colab. **Modulation of the host transcriptome by Coxiella burnetii nuclear effector Cbu1314.** Microbes and Infection, n. January, p. 1–10, 2015.

WEYRICH, Laura S. e colab. **A Type VI Secretion System Encoding Locus Is Required for Bordetella bronchiseptica Immunomodulation and Persistence In Vivo.** PLoS ONE, v. 7, n. 10, 2012.

WINK, David A e colab. **Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response.** v. 89, n. June, p. 873–891, 2011.

YAKIMCHUK, Konstantin e colab. **Borrelia burgdorferi infection regulates CD1 expression in human cells and tissues via IL1- β .** v. 41, n. 3, p. 694–705, 2012.

YANG, Shih Chun e colab. **The roles of the virulence factor IpaB in Shigella spp.**

in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. Microbiological Research, v. 181, p. 43–51, 2015.

YEN, Hilo e SUGIMOTO, Nakaba e TOBE, Toru. **Enteropathogenic Escherichia coli Uses NleA to Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation.** PLoS Pathogens, v. 11, n. 9, p. 1–23, 2015.

YUE, Simon C e colab. **Direct CD1d-mediated stimulation of APC IL-12 production and protective immune response to virus infection in vivo.** Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 184, n. 1, p. 268–76, 2010.

ZHOU, Yan e colab. **Hcp family proteins secreted via the type VI secretion system coordinately regulate Escherichia coli K1 interaction with human brain microvascular endothelial cells.** Infection and Immunity, v. 80, n. 3, p. 1243–1251, 2012.

ZWACK, Erin E. e colab. **Inflammasome activation in response to the yersinia type III secretion system requires hyperinjection of translocon proteins YopB and YopD.** mBio, v. 6, n. 1, 2015.