

RESUMO

Brucella abortus é uma bactéria intracelular facultativa que em humanos causa febre ondulante, endocardite, artrite e osteomielite. Em animais domésticos esta enfermidade causa aborto e infertilidade o que resulta em sérias perdas econômica na produção animal. A defesa inicial contra esta infecção é executada pela imunidade inata estimulada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estes padrões são estruturas moleculares comuns a diferentes grupos de patógenos e que são reconhecidos pelos receptores do tipo Toll (TLR). O fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) é uma molécula adaptadora essencial para sinalização através dos TLRs resultando na transdução de sinais e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Uma vez que não são bem conhecidos os mecanismos da imunidade inata que atuam na brucelose e os dados da literatura são contraditórios, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo*, o papel do adaptador MyD88 na resposta imune contra *Brucella abortus* bem como dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 utilizando camundongos deficientes para estas moléculas.

Camundongos MyD88^{-/-} e C57BL/6 foram inoculados com *Brucella abortus* da cepa S2308 e o número de bactérias foi avaliado no baço durante 1,2,3 e 6 semanas após a infecção. A produção de citocinas foi analisada em células provenientes dos linfonodos (IFN- γ e TNF- α) e em macrófagos inflamatórios (TNF- α e IL-12) estimulados pela *B. abortus* das cepas S2308 e RB51 mortas pelo calor (HKBa), bem como pelos respectivos LPS e lipídio A.

A brucelose murina mostrou-se exacerbada em animais deficientes para a molécula MyD88, durante todos os períodos analisados, o que é evidenciado

pelo grande número de bactérias presentes no baço. Além disso, os níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-12 encontrados foram significativamente menores em camundongos MyD88^{-/-} do que em C57BL/6 quando estimulados por HKBa, por LPS e pelo lipídio A. Esses resultados demonstram que a ativação dos TLR através da molécula MyD88 é essencial para o controle eficiente da infecção pela *Brucella abortus* durante a fase inata da resposta imune.

Além disso, a administração de TNF- α , IFN- γ e IL-12 recombinantes em animais MyD88, ou a infecção destes animais com adenovirus que induz a produção de IL-12, revelou um importante papel da IL-12 no aumento da resistência de camundongos MyD88^{-/-} à infecção pela *Brucella abortus*.

Para avaliar a contribuição dos principais TLR na resposta imune contra *Brucella*, animais deficientes em TLR2, TLR4 e TLR9 foram infectados com *B. abortus* da cepa S2308 e sacrificados após 2 semanas de infecção para a contagem do número de unidades formadoras de colônias no baço. Os resultados demonstraram que TLR2 e TLR4 não estão envolvidos na resistência a este microorganismo *in vivo*, porém, o receptor TLR9 tem um papel relevante visto que animais deficientes para essa molécula apresentaram maior susceptibilidade a infecção possivelmente devido a menor produção de IL-12. Nossos resultados sugerem ainda um papel das quimiocinas CCL3 e CCL5 na resposta imune contra a *Brucella* uma vez que sua produção se mostrou parcialmente dependentes do receptor TLR9.

Assim o presente trabalho confirma o papel predominante de MyD88 na resistência à *Brucella abortus* e evidencia, *in vivo*, o importante papel do receptor TLR9 para o controle da infecção. Ademais, definimos que o

mecanismo de susceptibilidade da infecção em animais MyD88^{-/-} é dependente parcialmente da produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas.

ABSTRACT

Brucella abortus is an intracellular pathogen, that undulant fever in humans and infertility among animals, resulting in serious economic losses. The initial host defense against bacterial infection is executed by innate immunity stimulated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These patterns are conserved molecular structures common to different groups of pathogens that are recognized by toll-like receptors (TLR).

Myeloid differentiation protein (MyD88) is an adaptor molecule critical for TLR signaling. Activation of MyD88-dependent pathways results in signaling and induction of pro-inflammatory cytokines. It is not clear how innate immunity initially recognize and respond to *Brucella* and the data reported in the literature are still contradictory. The main goal of this study was to evaluate the role of MyD88 adaptor molecule and TLR2, TLR4 and TLR9 receptors in *Brucella* immune response *in vivo*.

To determine the contribution of MyD88 in bacterial clearance, numbers of *Brucella* were monitored in the spleens of MyD88 KO and C57BL/6 mice at 1, 2, 3 and 6 weeks following *B. abortus* infection. The cytokines production was evaluated in lymph nodes cells (IFN- γ and TNF- α) and macrophages (TNF- α and IL-12) stimulated by heat killer *B. abortus* (HKBa) S2308 or RB51 strains and their purified LPS and lipid A. Murine brucellosis was marked exacerbated in MyD88 KO at all intervals studied and the levels of IFN- γ , TNF- α and IL-12 into the supernatant of HKBa, LPS or lipid A stimulated MyD88 KO cells were

totally abrogated compared to wild-type mouse cells. These results show that MyD88 is critical for host resistance to *Brucella abortus*.

Additionally, administration of recombinant cytokines in MyD88^{-/-} mice demonstrated that only IL-12 increased the *Brucella* control by reducing bacterial load.

In order to determine the role of TLRs in *Brucella* infection in vivo, TLR2, TLR4 and TLR9 KO mice were infected with virulent strain S2308 and quantified the number of bacteria in spleen. The results show that TLR2 and TLR4 are not required for clearance of *Brucella* in vivo. However, TLR9 deficiency enhances susceptibility to *B. abortus* infection probably due to the fewer levels of IL-12 production. Indeed, our data show that CCL3 and CCL5 are partially dependent of TLR9 receptor and suggests a role for these chemokines in *Brucella* immune response.

Thus, the present work confirms the predominant role of MyD88 in host resistance to *B. abortus* and it shows that TLR9 receptor is important to mount an effective immune response against this pathogen. Finally, we demonstrated that the mechanism involved in MyD88^{-/-} mice susceptibility relies on reduced IL-12 production by macrophages and dendritic cells.