

RESUMO

Brucella abortus é uma bactéria gram-negativa, patógeno intracelular, que causa febre ondulante, e artrite em humanos e infertilidade em animais, resultando em sérias perdas econômicas. O reconhecimento de *Brucella* por receptores associados ao reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs), é importante para o estabelecimento de uma resposta eficaz, uma vez que este culmina na polarização da resposta imune para o perfil Th1, determinante no controle da infecção por esta bactéria (Golding *et al.*, 2001). TLR4 (Campos *et al.*, 2004), TLR2 (Giambartolomei *et al.*, 2004) e TLR9 (Huang *et al.*, 2005) participam no reconhecimento da *Brucella abortus in vitro*, contudo, TLR 2 e TLR4 não são essenciais ao controle de infecções por *Brucella in vivo*. Já a molécula MyD88, principal adaptadora na sinalização de TLRs, possui papel relevante no controle de infecções desta bactéria *in vivo* (Weiss *et al.*, 2005). Embora *Brucella* seja capaz de estimular diversos TLRs, não se tem compreensão exata de qual modo o reconhecimento por TLRs é utilizado para montar uma resposta eficaz contra a bactéria. As células dendríticas (DCs) são as únicas células encarregadas da produção de IL-12 no baço em resposta a *Brucella abortus* inativada pelo calor (Huang *et al.*, 2001), o que as torna, além de potencial sítio de infecção (Billard *et al.*, 2005), células importantes no desencadeamento da resposta imune. O objetivo deste trabalho foi, então, avaliar o papel da molécula MyD88 e TLRs no reconhecimento da *Brucella abortus* em DCs. Surpreendentemente, ao contrário do esperado para uma bactéria gram-negativa, a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12p40 e a maturação de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) foi dependente da molécula MyD88. Estudamos então, BMDCs derivadas de camundongos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}, de onde podemos concluir que a maturação e produção de IL-12 e TNF- α em resposta à *Brucella abortus* nestas células é dependente de TLR2, mas não de TLR4. A dependência de TLR2 para a resposta de BMDCs a *Brucella* foi ainda confirmada através do bloqueio, com anticorpos específicos, deste receptor em células selvagens, o que as tornou irresponsivas a estimulação por *Brucella*. Interessantemente, os resultados obtidos variaram de acordo com a linhagem celular, já que macrófagos com TLRs bloqueados por anticorpos apresentaram dependência de TLR2 para a produção de TNF- α , mas não IL-12, assim como descrito por outros (Huang *et al.*, 2003). A maturação de células esplênicas de camundongos após estimulação *in vivo* foi mediada por MyD88, mas não por TLR2. Este resultado contraria, em parte, os dados observados *in vitro*, possivelmente devido à existência de outros subtipos de células dendríticas no organismo. O sutil papel do receptor do tipo Toll 4 nas respostas de BMDCs à *Brucella abortus*, condiz com as propriedades do lipopolissacárideo da *Brucella* que apresenta imunogenicidade reduzida (Lapaque *et al.*, 2005). O cenário emergente deste estudo é que *Brucella abortus* estimula

RESUMO – DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – DIOGO MAGNANI

produção de citocinas em subtipos de DCs de maneira dependente de TLR2. No baço, as células dendríticas reconhecem os PAMPs de *Brucella* por outro receptor, provavelmente TLR9. Esta produção resulta na diferenciação de linfócitos efetores em células Th1 que, por sua vez, produzem IFN- γ , ativando toda a cascata da resposta imune a jusante.

ABSTRACT

Brucella abortus is a gram-negative bacteria, intracellular pathogen, which causes undulant fever in humans and infertility among animals, resulting in serious economic losses. *Brucella* recognition mediated by pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs), is an important step to establish immune responses against this organism as it culminates in a strong Th1 polarization, desired for an efficient bacterial clearance (Golding *et al.*, 2001). TLR4 (Campos *et al.*, 2004), TLR2 (Giambartolomei *et al.*, 2004) and TLR9 (Huang *et al.*, 2005) participates in *in vitro* recognition of *Brucella abortus*. However, TLR 2 and TLR4 are not required for *Brucella* clearance *in vivo*. Nonetheless, the molecule MyD88, major downstream adaptor of TLRs, is required for *in vivo* control of *Brucella* infections (Weiss *et al.*, 2005). Dendritic cells (DCs), a potential reservoir of *Brucella* during infections (Billard *et al.*, 2005), are the sole producers of IL-12 in the spleen of mice stimulated with heat-killed *Brucella* (HKBa) (Huang *et al.*, 2001), which turns them critical cells to sustain efficient responses against the pathogen. The present work evaluated the role of MyD88 and TLRs in the DC recognition of *Brucella*. Surprisingly, the cytokine production and the maturation of bone marrow dendritic cells (BMDCs) in response to HKBa were completely impaired in absence of MyD88. BMDCs from TLR4^{-/-} mice were normal responders to *Brucella* stimuli, on the other hand, BMDCs from TLR2^{-/-} mice could neither mature nor induce TNF- α and IL-12 secretion in response to HKBa. *Brucella* TLR2-dependent IL-12 response in BMDCs was confirmed by inhibiting TLR2 activity by neutralizing this receptor in BMDCs with specific antibodies. Interestingly, macrophages showed different TLR requirements for responses against *Brucella* as TNF- α secretion induced by HKBa was TLR2-dependent, but IL-12 responses were neither TLR2, nor TLR4 dependent, in accordance to other groups (Huang *et al.*, 2003). The maturation of splenic DCs *in vivo* after administration of *Brucella* stimuli was MyD88-dependent, but TLR2-independent. The controversy of *in vivo* and *in vitro* data is, probably, due to different responses of DC subtypes analyzed. The lack of a major role for TLR4 mediated responses against *Brucella* can be explained by the less immunogenic, non-classical, lipopolysaccharide displayed by *Brucella* (Lapaque *et al.*, 2005). The scenery emerging of this study is: Even though TLR2 has a role in *Brucella abortus* cytokine responses in some DCs subtypes, splenic DCs recognize *Brucella* through other

ABSTRACT – MASTERS THESIS – DIOGO DE MATTOS MAGNANI

receptor, probably TLR9. This recognition leads to Th1 cells differentiation and secretion of IFN- γ , which, in turn, activates downstream responses.