



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Leonardo Augusto de Almeida

Tese de doutorado:

O papel do interferon do tipo I e sua sinalização na resposta imune inata contra a infecção pela Brucella abortus

Sergio Costa Oliveira
Orientador

Belo Horizonte
Março, 2010

Leonardo Augusto de Almeida

*O papel do interferon do tipo I e sua sinalização na
resposta imune inata contra a infecção pela *Brucella*
*abortus**

*Tese de doutorado apresentada ao
curso de pós-graduação em Bioquímica
e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais.*

Orientador: Prof. Sergio Costa Oliveira

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte

Março, 2010

Este trabalho foi financiado com verbas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Agradeço,

Ao Professor Sérgio Costa, pela orientação, profissionalismo, dedicação e confiança para que este trabalho pudesse ser realizado e meu sonho pudesse ser alcançado.

Ao Professor Aristóbolo M. Silva, pela co-orientação e produtiva colaboração. Além da amizade, gostaria de agradecer pela paciência e pela disponibilidade para uma boa discussão.

Aos Professores Anilton Vasconcelos e André Báfica, pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha noiva Patrícia pelo companheirismo, cumplicidade e amizade que crescem a cada dia reforçando ainda mais o nosso amor. Obrigado por me suportar tanto nos bons quanto nos maus momentos. Te amo!

Aos grandes amigos que conquistei no LIDI durante esses quatro anos de alegre e agradável convivência.

Aos amigos do LIDI da UFSC de Florianópolis/SC, que me auxiliaram durante meu doutorado “misto-quente”.

Aos amigos do ICB, principalmente a Diretoria de Bases: Nat, Pat, Tat, Luis, Bruno, Érica, Ricardo e Andrezza! Com vocês a caminhada até aqui se tornou muito mais prazerosa!

Aos meus amigos Viçosenses, sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

Aos meus familiares queridos que me auxiliaram na obtenção deste sonho! Em especial minhas sobrinhas lindas Maria Eduarda e Maria Clara!

Aos meus amigos das repúblicas por onde passei: Levi, Rafael, Bruno, Léo, Alessandro, Gustavo, Daniel e Natan, pela agradável convivência.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha vida acadêmica.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho e pela participação em minha vida. Muito obrigado.

Leonardo A. Almeida

Sumário

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O gênero <i>Brucella</i> e a Brucelose.....	17
1.1.1. <i>Descoberta – Febre de Malta</i>	17
1.1.2 <i>O gênero Brucella</i>	18
1.1.3 <i>A Brucelose</i>	20
1.1.4 <i>Patogênese</i>	21
1.2. A resposta imune à infecção pela <i>Brucella</i> spp.....	24
1.2.1 <i>Resposta imune inata à brucelose</i>	25
1.2.2 <i>Resposta imune adquirida à brucelose</i>	32
1.3. Interferon do tipo I	34
1.3.1 <i>Papel de interferon tipo I em infecções não virais</i>	37
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVO	41
3.1- <i>Objetivo geral</i>	42
3.2- <i>Objetivos específicos</i>	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 <i>Animais experimentais</i>	45
4.2 <i>Cepas bacterianas</i>	45
4.3 <i>Meios e condições de cultivo bacteriano</i>	45
4.4 <i>Infecção e análise da resposta imunológica</i>	46
4.4.1 <i>Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)</i>	46

4.4.2 Cultura de Esplenócitos.....	47
4.4.3 Dosagem de Citocinas	47
4.5 Cultura e Infecção de Macrófagos Derivados de Medula Óssea (BMMØs)	48
4.6 Análise de expressão diferencial de genes por PCR em tempo real.....	50
4.6.1. – Extração de RNA.....	50
4.6.2. – PCR em tempo real.....	50
4.7 Silenciamento gênico do IRF-3	52
4.8 Análise de morte celular em baço de animais infectados pela técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling)	53
4.9 Análise estatística	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. <i>Brucella abortus</i> induz a expressão de IFN-β.....	57
5.2. Camundongos deficientes para o receptor de interferon do tipo I (IFN-αβR ^{-/-}) apresentam um fenótipo de maior resistência à infecção por <i>B. abortus</i>	59
5.3 <i>B. abortus</i> induz morte celular esplênica.....	69
5.4. TRAIL é induzido pela sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I após a infecção por <i>B. abortus</i>	73
5.5. A indução da expressão de IFN-β pela infecção por <i>Brucella abortus</i> é dependente de IRF-3	75
5.6. O DNA da <i>B. abortus</i> é indutor do sistema de interferon do tipo I.....	80
5.7. A indução de IFN-β por <i>B. abortus</i> é independente de TLR9.....	82
5.8. A indução de IFN-β pelo DNA purificado de <i>B. abortus</i> é independente de TLR2 ou TLR4.....	83
5.9. <i>Brucella abortus</i> induz a expressão de IFN-β independente da molécula adaptadora TRIF, mas dependente de MyD88	87
5.10. O DNA purificado de <i>B. abortus</i> induz a sinalização mediada pela fosforilação de STAT1-Tyr701.....	92
6. CONCLUSÕES	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXOS	124
Artigos	125

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Sir David Bruce e bactérias do gênero <i>Brucella</i>	18
Figura 2. Incidência mundial de <i>B. abortus</i>	21
Figura 3. Modelo da interação entre <i>B. abortus</i> e as moléculas associadas ao microdomínio de lipídio e a formação do fagossomo replicativo na célula do hospedeiro.	23
Figura 4. Sinalização celular via TLRs em resposta à infecção por <i>Brucella</i> em macrófagos ou em células dendríticas.	31
Figura 5. Sinalização celular via IFN- $\alpha\beta$ R em resposta à sinalização mediada por TLRs.....	36
Figura 6. <i>B. abortus</i> induz a expressão de interferon do tipo I em BMMØs de camundongos 129Sv/Ev ou C57BL/6. Expressão de <i>IFN-β</i> em BMMØs de camundongos 129Sv/Ev (A) ou C57BL/6 (B). Expressão de <i>IFN-α4</i> em BMMØs de camundongos 129Sv/Ev (C) ou C57BL/6 (D).....	58
Figura 7. IFN- $\alpha\beta$ R ^{-/-} induz maior expressão de <i>IFN-β</i> ao ser infectado com <i>B. abortus</i> quando comparado ao 129Sv/Ev.	61
Figura 8. IFN- $\alpha\beta$ R ^{-/-} não é capaz de induzir a expressão de IFN- α ao ser infectado com <i>B. abortus</i>	62
Figura 9. Camundongos deficientes para o receptor de interferon do tipo I têm um aumento na capacidade de controlar a infecção por <i>B. abortus</i>	64
Figura 10. Células de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R ^{-/-} produzem maior quantidade de IL-12, IFN- γ e NO quando estimuladas com <i>B. abortus</i>	68
Figura 11. <i>B. abortus</i> induz morte celular esplênica dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I.....	71
Figura 12. <i>B. abortus</i> induz a expressão de TRAIL dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I.....	74
Figura 13. Papel central de IRF-3 na indução de interferon do tipo I através da sinalização mediada por vários receptores da imunidade inata.	76
Figura 14. O silenciamento gênico de IRF-3 diminui a expressão de <i>IFN-β</i> em células RAW 264.7 quando estimuladas com <i>B. abortus</i>	78

Figura 15. O silenciamento gênico de IRF-3 diminui a expressão de <i>TRAIL</i> em células RAW 264.7 quando estimuladas com <i>B. abortus</i>	79
Figura 16. O DNA de <i>B. abortus</i> é agonista do sistema de interferon do tipo I.	81
Figura 17. TLR9 não é essencial para a indução de <i>IFN-β</i>	83
Figura 18. A indução de <i>IFN-β</i> pelo DNA purificado de <i>B. abortus</i> é independente de TLR2 ou TLR4.....	86
Figura 19. TRIF não está envolvida no controle <i>in vivo</i> da brucelose murina.	88
Figura 20. TRIF não está envolvida na indução da expressão de <i>IFN-β</i> em BMMØs murinos.	89
Figura 21. MyD88 é essencial para a indução de <i>IFN-β</i>	92
Figura 22. <i>Brucella abortus</i> ou seu DNA purificado é capaz de induzir a sinalização dependente de IFN-αβR.....	94
Figura 23. Modelo de subversão do sistema imune por <i>B. abortus</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real .52

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

μg – Micrograma

μL – Microlitro

APC –Célula Apresentadora de Antígeno

BB – Brucella broth

BMMØ – Macrófago derivado de medulla óssea

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – ácido desoxirribonucléico

ELISA – Ensaio de absorção imunoenzimático

M-CSF (LCCM) – Fator estimulante de macrófago e granulócitos

HKBa – *Brucella abortus* morta pelo calor

IFN-γ – Interferon gama

IFN-α – Interferon alfa

IFN-β – Interferon beta

IFN-αβR – Receptor de interferon do tipo I

IFN-αβR^{-/-} – Deficiência para o receptor de interferon do tipo I

IL – Interleucina

IRAK – Cinase associada a receptor IL-1

IRF – Fator regulatório de interferon

ISRE – Elementos responsivos à estimulação por interferon

L-omp – Proteína de membrana externa lipidada

LPS – Lipopolissacarídeo

LRR – Repetições ricas em leucina

MAPK – Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MyD88 – Fator de Diferenciação Miéloide 88

MyD88^{-/-} – Deficiência do Fator de Diferenciação Miéloide 88

mM – Milimolar

NF-κB – Fator nuclear kappaB

NK – *natural killer*

PAMP – Padrão molecular associado à patógeno

PBS – Tampão salina fosfato

Rpm – Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino;

TIR – Região homóloga de receptores Toll/IL-1-receptor

Th1 – T *helper* 1

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 – Fator 6 Associado ao receptor de TNF

TRIF – Adaptador inductor de interferon- β que contém o domínio TIR

TRIF^{-/-} - Deficiência para o Adaptador inductor de interferon- β que contém o domínio TIR

TLR – Receptores do tipo Toll

TLR 2^{-/-} – Deficiência no receptor do tipo Toll 2

TLR 4^{-/-} – Deficiência no receptor do tipo Toll 4

TLR 9^{-/-} – Deficiência no receptor do tipo Toll 9

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*

UFC – unidades formadoras de colônia

HKBa – *Brucella abortus* inativada pelo calor (*Heat Killed Brucella abortus*)

RESUMO

Brucella abortus é uma bactéria Gram-negativa, patógeno intracelular facultativo, que causa febre ondulante e artrite em humanos e infertilidade em animais, resultando em sérias perdas econômicas. O reconhecimento de *Brucella* por PRRs, como os TLR2, TLR4 e TLR9, via molécula adaptadora MyD88, é importante para o estabelecimento de uma resposta imune eficiente e controle da infecção. Estimulados por uma série de novos trabalhos de imunidade inata relacionando a sinalização via IFN tipo I e a infecção de bactérias intracelulares, este trabalho objetivou elucidar o papel da ativação do sistema interferon do tipo I na resposta imune à infecção pela *B. abortus*. Inicialmente determinamos que a *B. abortus* induz a produção de *IFN- α* e *IFN- β* , sendo a produção de *IFN- β* mais proeminente. Para acessar o papel da sinalização mediada pelo IFN- $\alpha\beta$ R, camundongos deficientes para este receptor foram infectados e o número de bactérias viáveis recuperadas no baço destes animais foi inferior ao recuperado em baço de camundongos selvagens. Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} apresentaram um maior nível de IFN- γ e NO assim como um menor índice apoptótico no baço. Associado a este fenótipo, o nível de expressão do gene pró-apoptótico *TRAIL* se mostrou diminuído em BMMØs de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} e a sinalização mediada pela fosforilação de STAT1-Tyr701 se mostrou inexistente nestas células. Para entender a ativação do sistema de interferon do tipo I pela *B. abortus* o nível de expressão de *IFN- β* foi medido em BMMØs de camundongos TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-} ou TRIF^{-/-}, não apresentando nenhuma diferença quando comparadas com a expressão deste gene em células derivadas de camundongos selvagens. Contudo, a indução de *IFN- β* pela *B. abortus* foi dependente da molécula MyD88. Para entender o papel de IRF-3 na ativação de

interferon do tipo I, siRNAs para tal molécula foram utilizados se mostrando eficientes na diminuição da expressão de *IFN-β*. Algumas sinalizações intracelulares mediadas por receptores da imunidade inata que reconhecem ácidos nucleicos culminam na ativação do ativador transcricional IRF-3. Para determinar se o DNA da *B. abortus* seria um agonista capaz de induzir a expressão de *IFN-β*, BMMØs foram estimulados com a bactéria viva ou com o DNA purificado. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que tanto a bactéria viva quanto o seu DNA purificado são capazes de induzir a expressão de *IFN-β* independente dos receptores TLR2, TLR4 ou TLR9, mas dependente da molécula adaptadora MyD88 e de IRF-3. Finalmente, este trabalho sugere que ao induzir a produção de *IFN-β* e apoptose, a *B. abortus* é capaz de continuar seu processo infeccioso no hospedeiro escapando dos corpos apoptóticos através da fragmentação das membranas celulares, ou mesmo utilizando os corpos apoptóticos como veículo para infectar de maneira silenciosa outras células do hospedeiro restabelecendo o seu ciclo de infecção.

ABSTRACT

Brucella abortus is a Gram-negative bacterium, facultative intracellular pathogen, which causes undulant fever in humans and infertility among animals, resulting in serious economic losses. *Brucella* recognition mediated by PRRs, such as TLR2, TLR4 or TLR9 via MyD88 is an important step to establish immune responses against this organism and an efficient bacterial clearance. Based on recent studies that have revealed the involvement of IFN- $\alpha\beta$ R signaling pathway in bacterial infection, we decided to study the role of type I interferon system activation in the innate immune response against *B. abortus*. Firstly, we determined that *B. abortus* induced IFN- α and IFN- β production, being IFN- β more prominent. To access the role of IFN- $\alpha\beta$ R signaling, IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} mice were infected and the number of viable bacteria recovery from spleen showed to be lower when compared to wild type mice. IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} showed a greater increase in IFN- γ and NO level in culture cells when stimulated with *B. abortus* and a lower apoptotic index in spleen from these mice. Related to this phenotype, TRAIL expression showed to be decreased in BMMØs from IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} mice and STAT1-Tyr701 phosphorylation was demonstrated inexistent in these cells. To understand the type I interferon activation by *B. abortus*, the IFN- β expression was measured in BMMØs from TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-} or TRIF^{-/-}. It was demonstrated that IFN- β expression shows no difference in these mice when compared to control mice cells. However, IFN- β expression requires MyD88-signaling. Regarding IRF-3, siRNA demonstrated that IFN- β expression induced by *B. abortus* is IRF-3-dependent. Additionally, to determine if *B. abortus* DNA is capable to induce IFN- β , BMMØs were stimulated with either live bacteria or purified DNA. The results obtained here suggested that both live bacteria and their purified

DNA were capable to induce *IFN- β* in a TLR2, TLR4 or TLR9 receptors independent manner but dependent on MyD88 and IRF-3. In summary, this study suggests that *B. abortus* induces *IFN- β* production and apoptosis to continue the infectious process in the host. Apoptosis culminate not only with membrane cellular fragmentation leading the *B. abortus* release where these released bacteria are able to infect new adjacent host cells, but also the apoptotic bodies can be a vehicle to infect, in a silencing way, other host cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Brucella* e a Brucelose

1.1.1. Descoberta – Febre de Malta

Dentre as várias doenças infecciosas que assolam a humanidade, a brucelose pode ser caracterizada como uma importante zoonose que acompanha a história humana. A brucelose é uma doença antiga, sendo apontada como a quinta praga do Egito, onde dizimou a população de bovinos local (Pappas *et al.*, 2006). Uma análise dos esqueletos de fugitivos da erupção vulcânica de Pompéia revelou lesões típicas de brucelose em 17,4% dos adultos encontrados (Capasso, 2000). Em 1859, Martson descreveu uma fraqueza de origem infecciosa diferente da febre tifóide, que ele próprio sentia (Vassalo, 1992). Alguns anos depois esta doença foi descrita como “Febre do Mediterrâneo”, e atingiu vários marinheiros da Marinha Real Britânica alocados na Ilha de Malta, sendo que o principal sintoma apresentado era uma fraqueza crônica debilitante que podia se complicar a um reumatismo que afastava vários marinheiros das suas atividades diárias (Wyat, 1999).

A brucelose só foi documentada clinicamente no final do século XIX pelo então Capitão David Bruce que isolou a bactéria do baço de casos fatais da conhecida Febre de Malta em humanos (Nicoletti, 2002). A Febre de Malta era uma enfermidade muito difícil de diferenciar sintomática e clinicamente de outras febres endêmicas do litoral Mediterrâneo e que causava grande debilidade física à alguns soldados ingleses residentes nesta ilha e levava à morte. O agente desta patologia era uma bactéria que foi denominada, pelo seu descobridor, *Micrococcus melitensis*. Posteriormente, foi descoberto que a

mesma era transmitida através do consumo de leite de cabras residentes no local. Este alimento era comumente dado a pacientes hospitalizados como parte do tratamento contra o tifo, doença também presente na Ilha de Malta, por ser considerado um alimento fortificante. Em 1895, Bernhard Bang isolou de um caso de aborto bovino, um cocobacilo Gram-negativo, o qual foi denominado “*Bacillus abortus*”. Algum tempo depois foi observado uma grande semelhança entre o *Micrococcus melitensis* e o *Bacillus abortus* e decidiu-se denominar este novo gênero, *Brucella*, em homenagem ao seu descobridor, David Bruce (Figura 1) (Meyer, 1990).

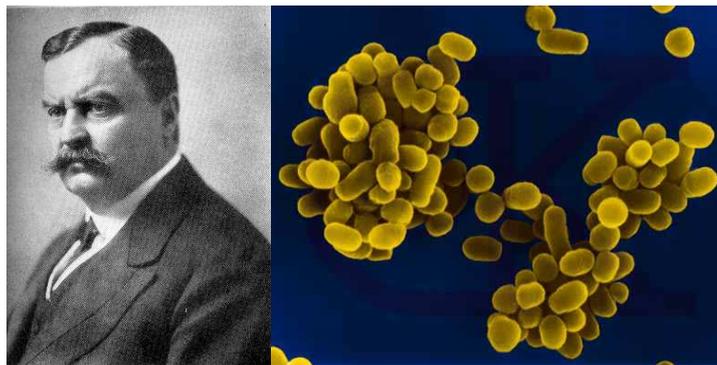


Figura 1. Sir David Bruce e bactérias do gênero *Brucella*

1.1.2 O gênero *Brucella*

Os organismos causadores da brucelose são cocobacilos gram-negativos, imóveis, que não esporulam e não encapsulam (Corbel e Morgan, 1984). A recente classificação filogenética baseada no seqüenciamento do gene que codifica a subunidade ribossomal 16S das bactérias desse gênero (Moreno *et al.*, 1990), as posicionou na classe α 2-*proteobacteria*, ordem *Rhizobiales*, família *Brucellacea* e gênero *Brucella*. Esta classificação coloca o

gênero *Brucella* relacionado a outros gêneros de bactérias patogênicas simbióticas de vegetais, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium meliloti*, bactérias fotossintéticas como *Rhodobacter sphaeroides* e patógenos intracelulares obrigatórios, como a *Rickettsia* (Ugalde, 1999).

Classicamente são reconhecidas seis espécies de *Brucella* que exibem características antigênicas, metabólicas e preferência ao hospedeiro distintas. As espécies são: *Brucella melitensis*, isolada de caprinos; *Brucella abortus*, isolada de bovinos; *Brucella suis*, isolada de suínos; *Brucella canis*, isolada de caninos; *Brucella ovis*, isolada de ovinos e *Brucella neotomae* que foi isolada de um tipo de rato do deserto Norte americano. Recentemente foi proposta a inclusão de duas novas espécies a este gênero, *Brucella cetaceae* e *Brucella pinnipediae* isoladas de mamíferos marinhos, *cetaceans* e *pinnipeds*, respectivamente; ampliando a escala ecológica e a importância deste gênero como zoonose (Cloeckert *et al.*, 2001). As quatro primeiras espécies - *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella canis* - são patogênicas para os seres humanos em ordem de severidade de infecção, tornando, assim, a brucelose uma zoonose de importância mundial.

O genoma do gênero *Brucella* é caracterizado por dois cromossomos circulares, geralmente de cromossomo I (2,1Mb) e cromossomo II (1,15 Mb) e um conteúdo GC de aproximadamente 57%. A partir do seqüenciamento do genoma de alguns representantes do gênero, foi observada uma alta similaridade de seqüência entre ácidos nucléicos, tendo uma homologia de 90% em aproximadamente 3200 – 3400 *open read frames* (ORFs), em cada genoma. Ademais, verificou-se que a maioria dos genes essenciais estão localizados no cromossomo I (Halling *et al.*, 2005).

1.1.3 A Brucelose

A brucelose é uma enfermidade que traz preocupações sanitárias, devido à sua possibilidade de transmissão ao homem, e econômicas, devido à diminuição na produtividade animal em consequência desta doença. Esta enfermidade é adquirida principalmente através do contato com animais infectados ou através do consumo de leite e seus derivados contaminados (Nicoletti, 1989). A contaminação direta por contato cutâneo-mucoso é a forma de infecção mais freqüente (75% dos casos). Já a contaminação digestiva (25% dos casos) é dividida essencialmente entre o consumo de leite e derivados contaminados e, raramente, pelo consumo de carne contaminada. Em humanos, a brucelose causa febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, enquanto nos animais domésticos afeta principalmente os órgãos reprodutivos, causando aborto e infertilidade temporária (Young, 1988).

Apesar da *B. melitensis* ser a mais patogênica, *B. abortus* é a principal fonte de infecção, por ser a espécie mais difundida no mundo (Figura 2) (Corbel, 1997). No Brasil, a brucelose bovina ocorre em todo o território nacional. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o número de casos de brucelose bovina no Brasil cresceu de aproximadamente 13.000 casos em 2000 para aproximadamente 80.000 casos em 2004. Além da possível contaminação dos consumidores de produtos de origem animal, a brucelose pode causar até 20% de perda da produtividade em rebanhos bovinos e tornar a carne, leite e seus derivados vulneráveis a barreiras

sanitárias no mercado internacional, causando um prejuízo de 32 milhões de dólares ao ano para a economia brasileira (Poester *et al.*, 2002).

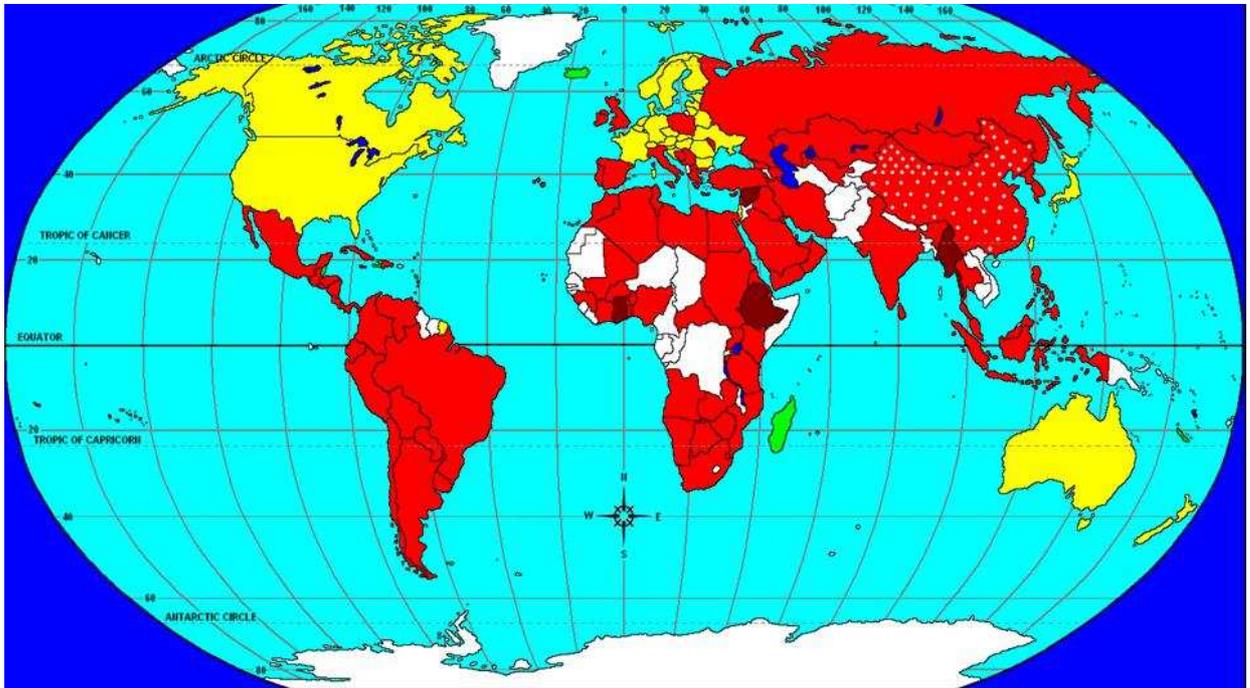


Figura 2. Incidência mundial de *B. abortus*.

No mapa as áreas em vermelho indicam as regiões onde há alta incidência de brucelose. Em amarelo estão destacado os países aonde a brucelose já foi erradicada e em verde aonde esta doença nunca foi reportada.

1.1.4 Patogênese

A patogênese causada pela infecção com a *Brucella* está associada a sua capacidade de evitar mecanismos extracelulares de defesa, como anticorpos e complemento, e proliferar dentro das células do hospedeiro (Sangari e Agüero, 1996). Embora a *Brucella* tenha a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas e não fagocíticas (Detilleux *et al.*, 1990; Jones e Winter, 1992), os macrófagos são considerados como as principais células de residência para este patógeno (Corbel, 1997).

O primeiro estágio da infecção pela *Brucella* se dá quando a bactéria entra em contato com superfícies mucosas do hospedeiro. A infecção ocorre quando a bactéria penetra na mucosa dos orifícios nasal, oral ou conjuntival. As bactérias penetram nas células do hospedeiro através da interação com domínios discretos na superfície celular compostos por proteínas ancoradas, e colesteróis denominados *lipid rafts* (Watarai *et al.*, 2002; Cutler *et al.*, 2005). De particular interesse, presentes nos *lipid rafts*, são os receptores do tipo *scavenger*. Acredita-se que parte da complexa interação que ocorre durante a infecção entre as membranas do patógeno e hospedeiro seja, mediada por ligações entre o lipídio-A, componente do lipopolissacárideo da membrana externa da bactéria, e receptores *scavenger* (SR-A) (Lapaque *et al.*, 2005). A forma de entrada da bactéria, baseada na interação dos *lipid rafts* com componentes intactos do LPS bacteriano (LPS liso), é extremamente importante para uma infecção bem sucedida, uma vez que esta determina o destino intracelular da bactéria (Figura 3) (Kim *et al.*, 2002).

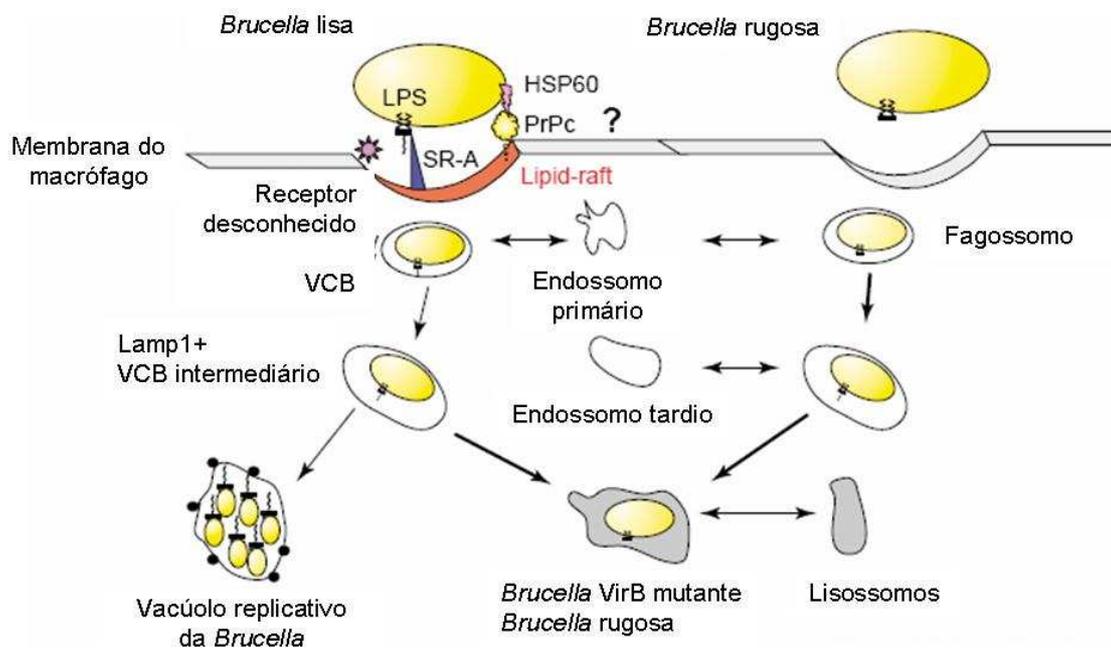


Figura 3. Modelo da interação entre *B. abortus* e as moléculas associadas ao microdomínio de lipídio e a formação do fagossomo replicativo na célula do hospedeiro. Adaptado de Lapaque *et al.* (2005).

No interior das células, a bactéria redireciona o tráfego do fagossomo através de um caminho único, alcançando o seu nicho de replicação. Embora esse processo seja heterogêneo, de acordo com o tipo celular, a maior parte das bactérias, usualmente, não consegue redirecionar o tráfego e acaba sendo destruída após a fusão com o lisossomo. As linhagens mais virulentas de *Brucella* evitam a fusão lisossomal e formam um nicho de replicação de sublocalização celular bem distinto na célula. A organela replicativa da *Brucella*, conhecida como “Brucelossomo”, retém características do retículo endoplasmático, como marcadores Rab específicos, e localização perinuclear (Gorvel e Moreno, 2002). Este mecanismo de escape do sistema imune do

hospedeiro torna-se a principal base para o estabelecimento da infecção crônica.

A internalização e o tráfego intracelular são eventos distintos, que envolvem mecanismos moleculares bacterianos específicos de cada uma destas fases. A maturação e acidificação do endossomo ativam genes associados à virulência. Dois sistemas de virulência se destacam nestes processos, o sistema de dois componentes BvrS/BvrR, que controla a expressão de determinantes moleculares necessários para a invasão, e o sistema secreção do tipo IV, que controla o direcionamento do tráfego intracelular da *Brucella*. Acredita-se que a localização privilegiada da *Brucella* no interior das células aumente a disponibilidade de metabólitos sintetizados ou transportados através do retículo endoplasmático (Gorvel e Moreno, 2002).

1.2. A resposta imune à infecção pela *Brucella spp.*

Os mecanismos do sistema imune que controlam a infecção por bactérias intracelulares são aqueles que ativam os mecanismos celulares que tornam a célula infectada apta a eliminar a bactéria, ou eliminam a célula infectada, tornando o patógeno acessível a outros mecanismos efetores do sistema imune (Abbas *et al.*, 2008). A resposta imune do hospedeiro contra a infecção pela *B. abortus* envolve a ativação da imunidade inata, principalmente através de receptores do tipo Toll, e ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno específicas (Oliveira e Splitter, 1995), além da resposta humoral. A produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com a participação notável de células

apresentadoras de antígenos (APCs), e linfócitos Th1 também são fundamentais para o controle da bactéria (Zhan *et al.*, 1996).

1.2.1 Resposta imune inata à brucelose

O sistema imune inato confere ao hospedeiro uma ampla proteção aos mais diversos patógenos e é baseado em um repertório de receptores que reconhecem componentes microbianos conservados (PAMPs – *pathogens-associated molecular patterns*) (Albiger *et al.*, 2007). A ligação destes PAMPs à seus receptores disparam sinais que ativam as APCs e facilitam a fagocitose dos microrganismos (Akira *et al.*, 2006). Esta reação inicial não é antígeno ou organismo específica, e é referida como imunidade inata (Golding *et al.*, 2001).

O reconhecimento dos PAMPs por APCs é uma etapa crucial para o estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra este patógeno. Este reconhecimento é mediado por receptores de padrões moleculares associados à patógenos (PRRs) como os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo RIG-I (RLRs), e os receptores do tipo NOD (NLRs).

Os três membros da família dos RLRs – RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation factor-5*) e LGP-2 (*laboratory of genetics and physiology-2*) – contêm os domínios de RNA helicase DExD/H-box e são capazes de reconhecer RNAs e induzir a expressão de interferon do tipo I (Yoneyama e Fujita, 2009). RIG-I e MDA5 possuem ainda dois domínios de recrutamento e ativação de caspases na região N-terminal que permite a interação com a proteína adaptadora MAVS. Esta interação acarreta na ativação de NF- κ B, IRF-3 e IRF-7 culminando com a ativação de interferon e

outros genes relacionados à resposta imune inata contra vírus (Rehwinkel *et al.*, 2010).

A família dos NLRs ultrapassa o número de 20 membros em mamíferos e a primeira evidência da existência de uma molécula intracelular capaz de detectar PAMPs bacterianos foi demonstrada por Philpott e colaboradores (2000) ao estudarem a ativação de NF- κ B no modelo de infecção por uma forma invasiva de *Shigella flexneri* em células epiteliais em cultura (citado por Fritz *et al.*, 2006). Os NLRs são caracterizados pela organização modular dos domínios LRRs (repetições ricas em leucina) na porção C-terminal, um domínio central de ligação de nucleotídeos e oligomerização (NOD ou NACHT), e um domínio N-terminal efetora de interação proteína-proteína. NOD 1 e NOD2 são membros dos NLRs que possuem na sua região N-terminal efetora o domínio CARD relacionado ao recrutamento e ativação de caspases e utiliza a molécula adaptadora RICK (RIP2). RICK é uma cinase que está associada à ativação de NOD1 e NOD2 para a sinalização eficiente mediada por NF- κ B e por MAPKs (Park *et al.*, 2007). Apesar já demonstrado ser importante no reconhecimento e na indução de citocinas pró-inflamatórias no modelo de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e ser considerado como candidato no reconhecimento de bactérias intracelulares, NOD2 parece não ter contribuição significativa no controle da infecção por *Brucella abortus in vivo* como demonstrado por nosso grupo recentemente (dados não publicados). Contudo, mais experimentos são necessários para determinar e confirmar o papel deste receptor na resposta à *B. abortus*.

Os receptores tipo Toll (TLRs), são proteínas transmembrânicas que se caracterizam por possuírem repetições ricas em leucina flanqueadas por

regiões ricas em cisteína em sua porção extracelular. A porção citoplasmática é caracterizada por um domínio TIR (Toll/IL-1 Receptor), fundamental para a sinalização intracelular (Akira *et al.*, 2006). O reconhecimento de componentes microbianos pelos TLRs inicia uma cascata de transdução de sinais que desencadeia a expressão de vários genes controladores da imunidade inata e adquirida (Re e Strominger, 2004).

Sob reconhecimento do ligante cognato, cada TLR desencadeia respostas distintas em associação com uma combinação diferente de quatro adaptadores contendo o domínio TIR (MyD88, TIRAP/MAL, TRIF ou TRAM), por meio de interações homofílicas desses domínios (Akira *et al.*, 2006). O fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), é uma molécula adaptadora de todos os TLRs, exceto TLR3. Quando associada ao TLR, MyD88 recruta as proteínas IRAK-1 (*IL-1R-associated kinase-1*), IRAK-4 e TRAF6 (*tumour necrosis factor receptor-associated factor 6*) em um complexo. IRAK-1 e TRAF6 se dissociam e interagem com TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase*), levando a ativação desta cinase. TAK1 ativada, fosforila IKK-b (I κ B cinase), e MAPcinase cinase 6 (MKK6) culminando com a degradação de I κ B. Essa degradação deixa o fator nuclear κ B (NF- κ B - *nuclear factor κ B*) livre para ser translocado ao núcleo, e ativar múltiplos genes de citocinas pro-inflamatórias como IL-12 e TNF- α , assim como a ativação de MAPKs, que possuem diversas funções biológicas.

Os receptores TLR3 e TLR4, entretanto, são capazes de utilizar uma via de sinalização independente do adaptador MyD88 (Yamamoto *et al.*, 2003), mediada pelos adaptadores TRAM e TRIF, com resultados distintos. A via de sinalização de TLRs MyD88-independente, é capaz de induzir a fosforilação de

elementos reguladores de interferon (IRFs), como IRF-3 e IRF7, culminando na produção de interferons do tipo I, em particular IFN- β (Fitzgerald *et al.*, 2003), seguido da ativação de genes induzidos por interferon, como IP10, CXCL10 e genes associados à maturação de células dendríticas. Outra característica desta via é a indução de NF- κ B tardiamente, em um processo mediado pela proteína cinase RIP-1 (Albiger *et al.*, 2007; Uematsu e Akira, 2007).

Resultados contraditórios têm sido reportados na identificação dos TLRs envolvidos na resposta a *Brucella*. Até o momento estas contradições não são bem definidas, mas, provavelmente se devem à diversidade das cepas da bactéria utilizada e à diversidade de *backgrounds* genéticos de camundongos *knockouts* utilizados.

O primeiro estudo evidenciando o envolvimento de TLRs na resistência a *B. abortus* utilizou camundongos deficientes para a molécula adaptadora MyD88 (Huang *et al.*, 2003). Esses animais foram incapazes de produzir IL-12 e TNF- α quando estimulados com *Brucella abortus* morta pelo calor (HKBA – *heat-killed B. abortus*). Outros trabalhos relataram o importante papel de MyD88 na resposta imune *in vivo*, demonstrando a exarcebação da brucelose murina em camundongos deficientes para tal molécula adaptadora (Macedo *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2005). Macedo *et al.* (2008) demonstraram a diminuição do processo de maturação de células dendríticas e a ausência de produção de IL-12 e TNF- α em macrófagos e células dendríticas em resposta ao estímulo com HKBa. MyD88 foi também relacionado ao desenvolvimento de células produtoras de IFN- γ e iNOS (Copin *et al.*, 2007).

TLR2 tem sido relacionado à expressão de TNF- α em células dendríticas e macrófagos estimulados com HKBa (Huang *et al.*, 2003), contudo Campos *et*

al. (2004) demonstraram que camundongos TLR2^{-/-} controlam a infecção por *Brucella* de maneira semelhante ao animal selvagem. Esse mesmo grupo demonstrou, utilizando camundongos C3H/HeJ, que TLR4 é importante para o controle do processo infeccioso. Já utilizando o modelo da *B. melitensis*, foi demonstrado que TLR4 e TLR9 cooperam na detecção da bactéria e no controle da infecção (Copin *et al.*, 2007) (Figura 4). A enzima carreadora de antígenos BLS (lumazine sintase) de *Brucella ssp.* foi caracterizada como agonista de TLR4 ao induzir a ativação de células dendríticas (Berguer *et al.*, 2006). Esta ativação culmina com respostas imune celulares baseadas na apresentação de antígenos numa via dependente da sinalização mediada pelo MHC de classe I elicitando uma resposta humoral efetiva contra a bactéria.

A interação da molécula adaptadora TRIF com TLR4, via TRAM, tem sido investigada na resposta imune contra LPS bacteriano. TRIF foi descoberto utilizando análises de similaridade de seqüência com os adaptadores já descritos devido à presença do domínio TIR em sua estrutura protéica. O papel fisiológico de TRIF foi avaliado através de análise da resposta imune a diversos agonistas de TLRs em camundongos deficientes para esse adaptador (Yamamoto *et al.*, 2003). TRIF foi primeiramente associado à sinalização via TLR3 em ensaios *in vitro*. Células dominante-negativas para TRIF tiveram a ativação de IRF-3 inibida na via dependente de TLR3 (Yamamoto *et al.*, 2003). Estudos adicionais utilizando camundongos TRIF^{-/-} mostraram o papel desse adaptador na transdução de sinal dependente de TLR3 e TLR4 na ativação de NF-κB e IRF-3 e, conseqüentemente a indução de citocinas pró-inflamatórias e IFN-β, respectivamente (Yamamoto *et al.*, 2003). Contudo, a molécula adaptadora TRIF parece não estar envolvida no controle da *Brucella*, uma vez

que o camundongo deficiente para esta molécula apresentou características semelhantes ao camundongo selvagem C57BL/6 no controle da infecção (Copin *et al.*, 2007).

TLR9 também foi relacionado pelo nosso grupo ao reconhecimento e desencadeamento da sinalização da resposta imune inata para o controle da *Brucella*. Animais deficientes para TLR9 são mais suscetíveis a infecção que animais normais, sendo este receptor descrito pelo nosso grupo como o TLR mais importante no controle da infecção por *B. abortus*. Além disso, macrófagos e células dendríticas de camundongos TLR9^{-/-} produzem menos IL-12 quando comparados ao controle, contudo a produção de TNF- α não é afetada sob estimulação com *Brucella* (Huang *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2008).

Uma nova família de moléculas bacteriana foi identificada recentemente como responsáveis pela subversão do sistema imune inato durante o processo invasivo. A proteína Btp1 (*Brucella TIR protein 1*) isolada de *B. abortus* e a proteína TcpC de *B. melitensis*, assim como a proteína TlpA de *E. coli* e *S. enterica* serovar Enteritidis apresentam alta similaridade de sequência baseada principalmente na presença do domínio TIR característico das proteínas da família de receptores Toll/IL1 (Diacovich e Gorvel, 2010). Mutantes de *B. abortus* que não possuem a proteína Btp1 funcional foram incapazes de controlar a maturação de células dendríticas (Salcedo *et al.*, 2008). Estas proteínas tem a capacidade de interferir com a sinalização mediada por TLRs (Cirl *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2008). Especificamente, Btp1 e TcpC interferem com a ativação da resposta a jusante dependente da via de sinalização mediada por TLR2 utilizando MyD88 como molécula adaptadora e

além disso, foi demonstrado que tais moléculas bacterianas interagem com o adaptador TIRAP bloqueando a ativação de NF- κ B (Salcedo *et al.*, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2009).

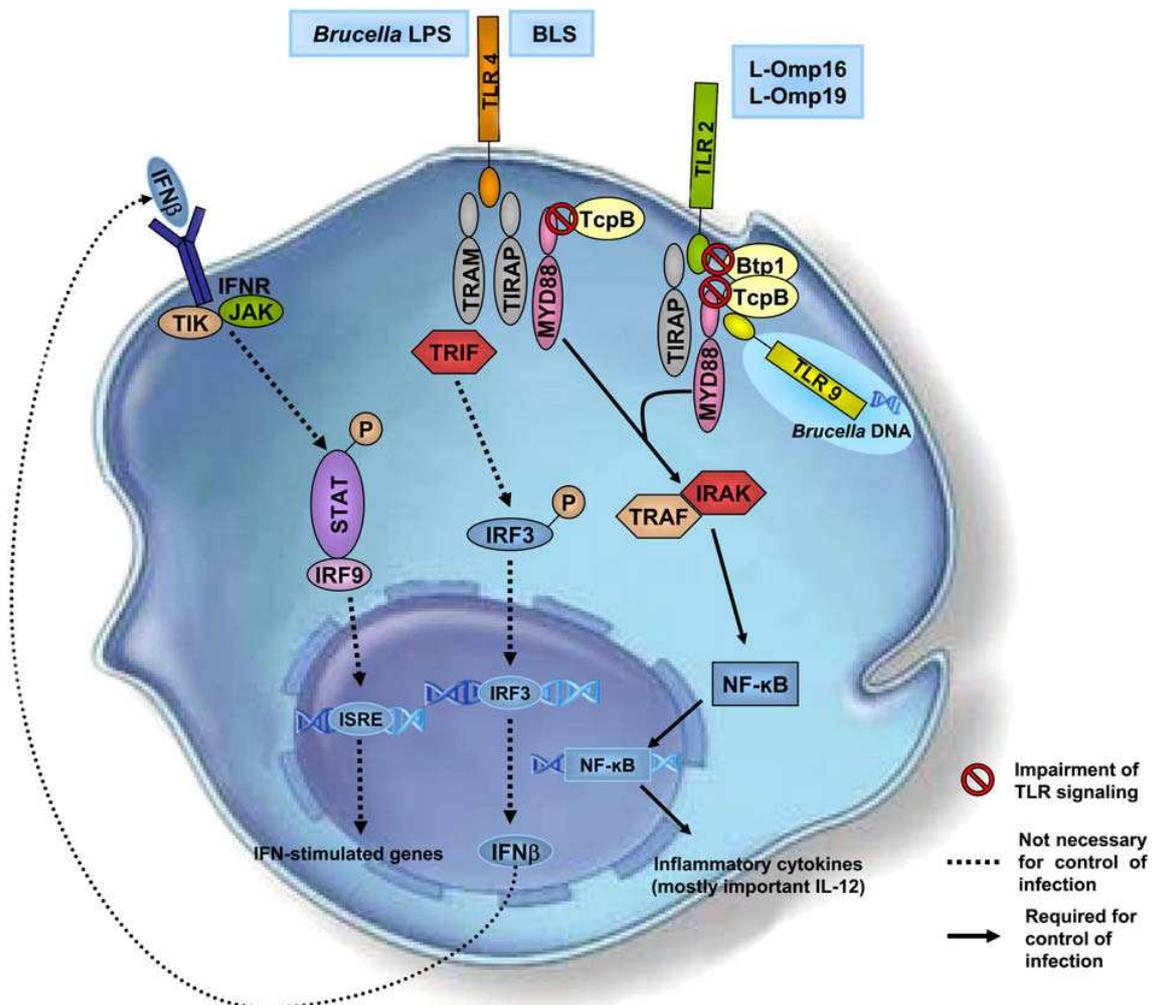


Figura 4. Sinalização celular via TLRs em resposta à infecção por *Brucella* em macrófagos ou em células dendríticas.

O reconhecimento de moléculas associadas à *Brucella abortus* por TLR2 (proteínas da membrana externa, Omp16 e Omp19), TLR4 (LPS da *Brucella* e a *Brucella* lumazine sintase – BLS) e/ou TLR9 (DNA da *Brucella*), ativa a sinalização intracelular via MyD88 resultando na ativação de NF- κ B, MAPKs e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Btp1 e TcpB atuam como moléculas da bactérias capazes de subverter o sistema imune do hospedeiro por interagir com as moléculas do sistema imune inato via domínios TIR interferindo na sinalização mediada por TLR2 e TLR4 principalmente. Adaptado de Oliveira *et al.*, 2008.

1.2.2 Resposta imune adquirida à brucelose

A imunidade adquirida contra a infecção por *B. abortus* é mediada principalmente por linfócitos T e seus produtos. Os anticorpos têm o papel de opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção (Cheers e Ho, 1983), tornando a fagocitose pelos macrófagos mais eficiente (Winter *et al.*, 1989). Entretanto, anticorpos não reduzem a taxa de crescimento intracelular da bactéria *in vivo*, e não conferem resistência a animais suscetíveis. A habilidade da *B. abortus* de sobreviver e replicar dentro do macrófago e outras células do hospedeiro torna-a inacessível aos mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (Cheers & Ho, 1983). Dessa forma, a proteção efetiva contra essa infecção é dependente da imunidade celular mediada por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 e de linfócitos T CD8⁺ (Araya *et al.*, 1989).

Os linfócitos do tipo Th1 secretam IFN- γ como principal citocina efetora contra infecções causadas por bactérias intracelulares, incluindo a *Brucella* (Jones e Winter, 1992). Esta citocina possui duas principais funções no controle da brucelose: (1) ativa os macrófagos a produzirem reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, além de enzimas proteolíticas capazes de destruir as bactérias fagocitadas; e (2) estimula a produção de subclasses de anticorpos, como IgG2a em camundongos, ativando o sistema de complemento e opsonizando a bactéria de forma a facilitar a fagocitose e favorecer as funções efetoras dos macrófagos (Abbas *et al.*, 2008).

A contribuição das células T CD8⁺ no controle da brucelose foi efetivamente determinada por Oliveira & Splitter (1995). Estes pesquisadores mostraram que a brucelose murina foi exacerbada em camundongos deficientes em linfócitos T CD8⁺ (MHC classe I) quando comparada a animais normais ou deficientes em células T CD4⁺ (MHC classe II), evidenciando claramente o impacto das células T CD8⁺ na imunidade mediada por células no controle da brucelose experimental. O perfil de citocinas que caracterizam uma resposta imune Th1 foi demonstrado em esplenócitos primados com *Brucella* de camundongos deficientes tanto para camundongos deficientes para células T CD8⁺ quanto para animais normais ou deficientes em células T CD4⁺, marcado por elevados níveis da expressão de mRNA ou da produção de IFN- γ e níveis basais dos transcritos de *IL-2* e *IL-4*. Ademais, foi demonstrado por estes autores o papel predominante de células CD8⁺ CTL na eliminação de *Brucella* que infectam macrófagos, ilustrando o papel predominante de MHC classe I no controle da infecção por *B. abortus*.

Citocinas derivadas de macrófagos, como IL-12 e TNF- α , consideradas como pró-inflamatórias, contribuem para o controle inicial da brucelose. IL-12 estimula as células NK e linfócitos T a produzirem IFN- γ e TNF- α que, conseqüentemente, ativam os macrófagos para destruírem os patógenos intracelulares. No modelo da brucelose murina, a depleção da IL-12 endógena aumenta a susceptibilidade dos camundongos à infecção pela *B. abortus* com diminuição na produção de IFN- γ e óxido nítrico e um aumento no número de bactérias no fígado e no baço (Zhan *et al.*, 1996).

1.3. Interferon do tipo I

Há pouco mais de meio século, as primeiras citocinas foram descobertas e caracterizadas como fatores solúveis que mediavam uma forma de interferência no processo de infecção viral (Isaacs e Lindermann, 1957). Devido ao seu papel descrito em interferir na replicação viral, essas citocinas foram nomeadas de interferons (IFNs). Nas décadas seguintes, ficou evidenciado que os IFNs compreendiam uma gama de proteínas com características bioquimicamente e funcionalmente distintas (Ho e Armstrong, 1975).

De acordo com as características de resistência ou sensibilidade à variação de calor ou pH, e de fatores imunoestimulantes de linfócitos e macrófagos, os IFNs foram inicialmente classificados como IFN do tipo I ou IFN do tipo II (Ho e Armstrong, 1975). Atualmente, três grupos distintos são conhecidos: tipo I, II ou III (Pestka *et al.*, 2004).

Há somente um IFN do tipo II descrito, IFN- γ (Scroder *et al.*, 2004). Já IFNs do tipo I consistem em uma família de cerca de 20 membros com certas variações entre espécies e, dentro do próprio grupo há certo grau de variabilidade na sua estrutura homóloga (Pestka *et al.*, 2004; Decker *et al.*, 2005). Durante uma infecção viral ou bacteriana, IFN- α e IFN- β são os IFNs do tipo I sintetizados (Bogdan *et al.*, 2004).

Enquanto um único gene que codifica o IFN- β é encontrado no genoma da maioria dos mamíferos, um número maior de genes que codificam IFN- α são conhecidos. Todos os genes que codificam IFN do tipo I estão agrupados em um locus no mesmo cromossomo (cromossomo 9 em humanos e

cromossomo 4 em camundongos). IFN- α constitui uma família de 13 genes funcionais em humanos e 14 em camundongos, contudo não há uma explicação de significância biológica clara para esse maior número de genes IFN- α quando comparado a um único gene IFN- β (Decker *et al.*, 2005). Já foram descritas atividades específicas para cada tipo de IFN- α , como a variação na capacidade de ativar células *natural killers* (NKs) (Pestka *et al.*, 2004). Contudo, é mais comum encontrar correlações positivas entre os IFNs- α durante atividades antivirais e antiproliferativas do que diferenças entre essas citocinas (van Pesch *et al.*, 2004).

A síntese de IFN- β estimula a sinalização através do receptor de IFN do tipo I (IFN- $\alpha\beta$ R). IFN- $\alpha\beta$ R é composto por duas subunidades: IFNAR-1 e IFNAR-2 (Brierley *et al.*, 2002). A via clássica de sinalização desse receptor envolve a fosforilação de Janus cinases (Jak1, Tyk2) e subsequente ativação de transdutores e ativadores transcricionais (STAT1, STAT2), que levam a indução transcricional de genes contendo em seus promotores elementos responsivos à estimulação por interferon (ISRE - *IFN-stimulated response elements*), como IRF7 (Bogdan *et al.*, 2004). IRF7 e IRF-3 são fosforilados em nível citoplasmático por IRF cinases, como TBK1 (*Tank-binding kinase 1*), e, sob a translocação para o núcleo, amplificam de uma maneira positiva os efeitos da sinalização via IFN do tipo I. De forma autócrina e/ou parácrina, IFN- α e IFN- β podem interagir novamente com IFN- $\alpha\beta$ R e restabelecer a sinalização (Figura 5).

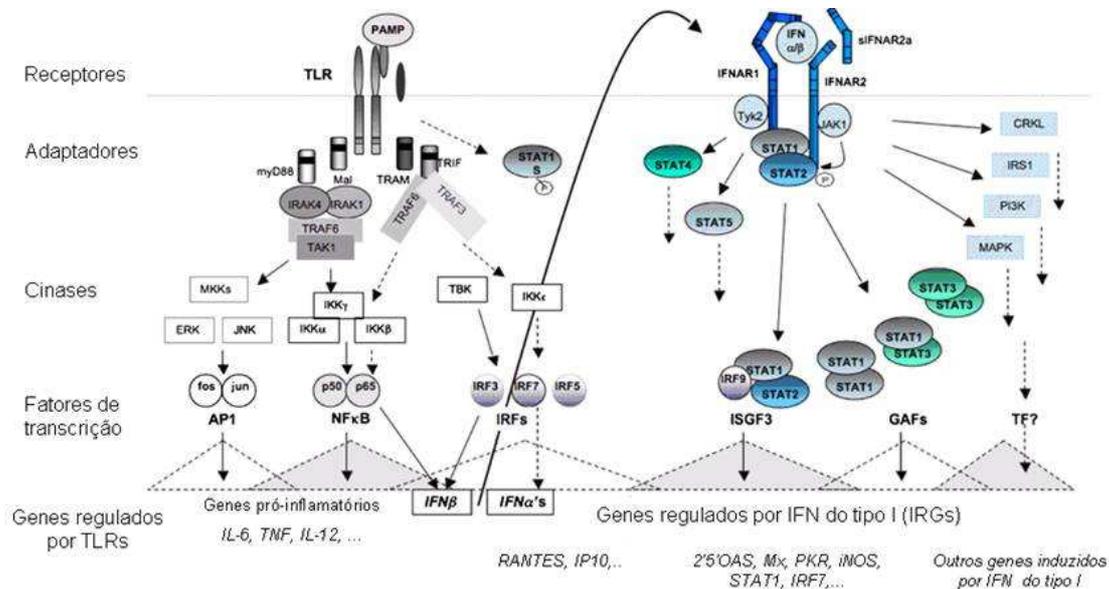


Figura 5. Sinalização celular via IFN- $\alpha\beta$ R em resposta à sinalização mediada por TLRs. A via de sinalização de TLRs MyD88-independente, é capaz de induzir a fosforilação de elementos reguladores de interferon (IRFs), como IRF-3 e IRF7, culminando na produção de interferons do tipo I, em particular IFN- β seguido da ativação de genes induzidos por interferon.

Recentemente, IFN- α e IFN- β têm recebido mais atenção dos imunologistas devido a algumas descobertas atuais como: (i) um melhor entendimento das características funcionais e fenotípicas das células produtoras de IFN tipo I; (ii) a determinação de microrganismos patogênicos ou produtos microbianos que são fortes indutores de IFN tipo I; (iii) a determinação de novas funções imunoregulatórias dessas citocinas; (iv) atividades antimicrobianas dessas citocinas durante a resposta imune inata a certos patógenos não virais; e (v) a descrição de novas vias de sinalização que são utilizadas por IFN tipo I tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Bogdan *et al.*, 2004).

1.3.1 Papel de interferon tipo I em infecções não virais

Embora IFN do tipo I seja crucial para a defesa do hospedeiro contra infecções virais, essas citocinas também são induzidas durante infecções bacterianas (Decker *et al.*, 2005). Vários gêneros de bactérias gram-negativas estimulam a síntese de IFN do tipo I durante o processo de interação ou invasão celular (Bogdan *et al.*, 2004, Decker *et al.*, 2005).

Os primeiros efeitos de IFN tipo I descritos em uma infecção não viral foi na década de 1960 na infecção por *Chlamydia spp.* (Sueltenfuss e Pollard, 1963). Apesar de seu ciclo de infecção ser intracelular, *Chlamydia pneumoniae* induz IFN tipo I envolvendo a via de sinalização dependente de TLR4 e da molécula adaptadora MyD88 (Rothfuchs *et al.*, 2004). Esta indução está associada à resposta protetora contra tal bactéria uma vez que é evidenciado que IFN- α/β induz a produção de IFN- γ (Rothfuchs *et al.*, 2004). Outra bactéria que estimula macrófagos e células NK a produzir IFN do tipo I é *Listeria monocytogenes*. IFN- β é induzido em macrófagos derivados de medula óssea de forma dependente de IRF-3 e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) durante a infecção por *L. monocytogenes* (O'Connell *et al.*, 2004, O'Riordan *et al.*, 2004). Entretanto, o número de bactérias recuperadas de animais deficientes para o receptor de IFN tipo I (IFN- $\alpha\beta R^{-/-}$) foi 10^2 - 10^3 vezes menor quando comparado ao camundongo controle (129Sv/Ev *background*) (Fehr *et al.*, 1997). Tais achados foram confirmados recentemente e foram associados a um efeito deletério da sinalização via IFN do tipo I para o hospedeiro com a expressão de genes pró-apoptóticos, ocorrência de lesões apoptóticas no baço e a redução de níveis de IL-12-p70 no soro desses animais (O'Connell *et al.*,

2004, O’Riordan *et al.*, 2004, Auerbach *et al.*, 2004 e citado por Bogdan *et al.*, 2004).

No modelo de infecção com *Mycobacterium tuberculosis*, camundongos IFN- α β R^{-/-} não mostraram a resistência alterada ao patógeno (Cooper *et al.*, 2000). Contudo, um efeito protetor parcial de IFN do tipo I em camundongos infectados com *M. avium* foi observado. Além disso, a administração contínua de IFN- β nos camundongos BALB/c culminou com a diminuição de pelo menos dez vezes na quantidade de bactérias recuperadas no baço e no fígado destes animais (Denis, 1991). Já em macrófagos humanos, o tratamento com IFN- α ou IFN- β acarretou aumento do crescimento intracelular de *M. bovis* (Bouchonnet *et al.*, 2002).

Uma diferente estratégia para amplificar a sinalização via IFN do tipo I é através da ligação do CpG de DNA não metilado à TLR9. Essa interação acarreta em uma rápida montagem de um complexo de sinalização que inclui MyD88, TRAF-6 (tumour-necrosis factor receptor-associated factor 6), IRAK1 (interleukin-1- receptor-associated kinase 1), IRAK4 e IRF7. A ativação de IRF7 culmina com a transcrição dos genes *IFN- α* e *IFN- β* (Decker *et al.*, 2005).

A primeira demonstração que uma bactéria induz IFN- α dependente de TLR9 foi utilizando HKBa (Huang *et al.*, 2005). IFN- α foi detectado em soro de camundongos três horas após injeção de HKBa e em camundongos TLR9^{-/-}, o nível dessa citocina foi reduzido drasticamente.

2. JUSTIFICATIVA

A brucelose é uma doença que ocorre de maneira endêmica em todo o território brasileiro, principalmente a brucelose bovina, por ser esta espécie a mais difundida e com maior expressão econômica no país. Além da possível contaminação dos consumidores de produtos de origem animal, a brucelose pode causar até 20% de perda da produtividade em rebanhos bovinos e tornar a carne, leite e seus derivados vulneráveis a barreiras sanitárias no mercado internacional, o que causa um prejuízo de 32 milhões de dólares ao ano para a economia brasileira. A patogênese causada pela infecção com a *Brucella* está associada a sua capacidade de evitar mecanismos extracelulares de defesa, como anticorpos e complemento, e proliferar dentro das células do hospedeiro. Um grande número de patógenos tem a capacidade de evadir dos mecanismos efetores extracelulares do sistema imune e utilizar da própria maquinaria celular do hospedeiro para sua propagação. Para garantir um processo efetivo de combate a esses patógenos, mecanismos efetores intracelulares são ativados tais como os mecanismos classicamente conhecidos como antivirais via interferons do tipo I (Stockinger *et al.*, 2004). Pesquisas no papel do IFN do tipo I em infecções não virais começaram há cerca de 50 anos atrás, mas este papel ainda continua pouco entendido. Estimulados por uma série de novos trabalhos relacionando a sinalização via IFN tipo I e a infecção por bactérias intracelulares, assim como a indução de IFN do tipo I pela *B. abortus*, este trabalho encontra sua justificativa na tentativa de elucidar o envolvimento da sinalização mediada por IFN do tipo I e da sinalização mediada por essas citocinas na resposta imune inata contra a *B. abortus*. Os dados desse trabalho têm um impacto no melhor entendimento da relação parasita-hospedeiro e no desenvolvimento de novas vacinas contra essa enfermidade.

3. OBJETIVO

3.1- Objetivo geral

Determinar o papel do interferon do tipo I e da sua sinalização celular para o controle da infecção com a *B. abortus*.

3.2- Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a indução de interferon do tipo I por *B. abortus* *in vitro* e *in vivo*.
- ✓ Determinar o papel do receptor de interferon do tipo I (IFN- $\alpha\beta$ R) no controle da brucelose murina e na produção de citocinas e óxido nítrico.
- ✓ Avaliar o perfil de morte celular no baço de animais IFN- $\alpha\beta$ R e 129Sv/Ev infectados com a *B. abortus*.
- ✓ Avaliar o papel da ativação de genes induzidos por interferon do tipo I após infecção por *B. abortus*.
- ✓ Identificar possíveis componentes de *B. abortus* como agonista para a indução de IFN- β .

- ✓ Avaliar o envolvimento dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 na indução de IFN- β pela *B. abortus*.

- ✓ Determinar o papel das moléculas adaptadoras TRIF e MyD88 na indução de IFN- β pela *B. abortus*.

- ✓ Definir as vias de sinalização celular envolvidas na produção de IFN- β em macrófagos ativados com a *B. abortus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para a molécula TRIF e do receptor IFN- $\alpha\beta$ R gentilmente cedidos pelo Dr. Ricardo Gazzinelli e pelo Dr. Luiz F. Reis (Instituto Ludwig – São Paulo), respectivamente. Camundongos geneticamente deficientes para TLR2, TLR4 ou TLR9 e para a molécula adaptadora MyD88 foram gentilmente cedidos por Shizuo Akira da Universidade de Osaka no Japão. Esses animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB/UFMG. Camundongos 129Sv/Ev ou C57BL/6 usados como controles foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG. Os animais foram utilizados com 6 a 8 semanas de idade.

4.2 Cepa bacteriana

Utilizou-se neste estudo a cepa lisa S2308 (virulenta) da *B. abortus* disponíveis em nosso laboratório.

4.3 Meios e condições de cultivo bacteriano

A cepa S2308, que foi utilizada na infecção ou como antígeno na cultura de células, foi crescida em meio *Brucella Broth* líquido (BB) (DIFCO), a 37°C sob agitação constante. Após três dias de crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada e o sedimento foi ressuspendido em tampão salina fosfato (PBS)

0,15M pH 7,4 (2,8mM Na₂PO₄; 7,2mM Na₂HPO₄; 0,14 M NaCl). Alíquotas destas culturas foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio BB solidificado com 1,5% de ágar bacteriológico. Após incubação por 72 horas a 37°C, foi possível determinar a concentração bacteriana presente na suspensão através da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) visualizadas na placa.

4.4 Infecção e análise da resposta imunológica

Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}, TRIF^{-/-} e 129Sv/Ev foram infectados intraperitonealmente com 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. abortus* da cepa S2308. Duas semanas após a infecção, 5 animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical para a extração do baço. Cada experimento foi realizado três vezes para confirmação dos resultados obtidos.

4.4.1 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)

Os baços extraídos de cada animal foram macerados em 10 mL de PBS, com o auxílio de uma peneira de aço e diluídos serialmente. As diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram plaqueadas em duplicata, em meio BB ágar. Após 3 dias de incubação à 37°C, o número de UFC foi determinado. Os resultados foram expressos como a média do log de UFC de cada grupo.

4.4.2 Cultura de Esplenócitos

A suspensão de células obtidas do baço macerado em PBS foi utilizada para cultura de esplenócitos segundo descrito por Macedo *et al.* (2008). As hemácias foram lisadas utilizando a solução ACK (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA [pH7.3]) e esplenócitos foram cultivados em placas de 96 poços com fundo em “U” a uma concentração de 10⁶ células por poço. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino inativado por calor e 1% de penicilina e estreptomicina.

As culturas foram estimuladas com a bactéria viva S2308 (10⁸ UFC), HKBA (*heat killed B. abortus*) (10⁹ UFC), 5µg/mL de Concanavalin A, ou meio de cultura (controle não estimulado). O sobrenadante das culturas foram coletados em tubos estéreis 48 ou 72 horas após o estímulo para a análise de expressão de citocinas.

4.4.3 Dosagem de Citocinas

A dosagem das citocinas IFN-γ e IL-4 nos sobrenadantes das culturas celulares foram realizadas pelo método de ELISA do tipo sanduíche utilizando os kits DuoSet (R & D System ou BD) de acordo com o protocolo do fabricante.

4.5 Cultura e Infecção de Macrófagos Derivados de Medula Óssea (BMMØs)

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos 129Sv/Ev, IFN- α R^{-/-}, TRIF^{-/-}, C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-}, ou MyD88^{-/-} foram sacrificados através de deslocamento cervical e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. As extremidades proximal e distal destes ossos foram cortadas e foi injetado 5 mL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GIBCO) por osso.

A suspensão de células obtida foi centrifugada a 600g por 10 minutos, a 4°C, e o precipitado foi ressuscitado em 12 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1M (GIBCO) e 10% de LCCM (*L929 cell conditioned medium*), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos).

As amostras obtidas foram ressuscitadas em 10 mL de meio e submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70µm (BD FALCON) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Logo em seguida, as células foram plaqueadas em placas de Petri para cultivo celular e incubadas por duas horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, de maneira a obter apenas células que ainda não se diferenciaram. Para isso, as células não aderentes foram coletadas e ressuscitadas em 2 mL de DMEM suplementado. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 24 poços na concentração de 5x10⁵ células/mL/poço. As placas foram então incubadas a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂.

Quatro dias após o plaqueamento das células, foram adicionados 100 µL de LCCM por poço e no sétimo dia, o meio de cultura foi trocado por um novo

contendo também 10% de LCCM. No décimo dia de cultura as células estavam completamente diferenciadas em macrófagos (Gomes e Appelberg, 2002).

Após a completa diferenciação das células em BMMØs, elas foram estimuladas com a cepa S2308 da *B. abortus* (MOI de 50:1), HKBa, Pam3C, LPS de *E. coli*, LPS purificado de *B. abortus* (Campos *et al.*, 2004), L-omp19 (1µg/mL) (Giambartolomei *et al.*, 2004), DNA purificado de *B. abortus* (1µg/well) ou DNA de *B. abortus* tratado com DNase.

Para a infecção dos macrófagos derivados da medula óssea (BMMØs) foi adicionada a cepa S2308 da *B. abortus* no décimo dia de cultura (MOI de 50:1). A placa de cultura dos BMMØs foi centrifugada por 10 minutos a 600g, de forma a garantir que as bactérias entrassem em contato com os macrófagos. Após 30 minutos de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂, cada poço foi lavado 4 vezes com 0,5mL de HBSS. Foi acrescentado 500µL de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de HEPES 1M, 10% de LCCM e 100µg/mL de gentamicina (GIBCO) por poço e a placa de cultura foi incubada à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂, por 90 minutos. Os poços foram lavados novamente e foi acrescentado a cada poço 1mL de DMEM suplementado, acrescido de 10µg/mL de gentamicina. A placa foi reincubada a 37°C e sob atmosfera de CO₂. O sobrenadante das culturas foi coletado 24 horas após a infecção para a determinação da concentração de IL-12, IFN-β ou IFN-α por ELISA. Às células aderidas foi adicionado a solução A do kit Illustra™ RNAspin Mini (GE Healthcare) para posteriores análises de expressão gênica por PCR em tempo real como descrito abaixo.

4.6 Análise de expressão diferencial de genes por PCR em tempo real

4.6.1. – Extração de RNA

Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} e 129Sv/Ev foram infectados intraperitonealmente com 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. abortus* da cepa S2308. Duas semanas após a infecção, 3 animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical para a extração do baço. Metade do órgão foi utilizado para extração de RNA total de acordo com dados do fabricante do kit Illustra™ RNAspin Mini (GE Healthcare). O RNA total de BMMØs infectados com *B. abortus*, provenientes de camundongos utilizados neste estudo, também foram extraídos conforme instruções do fabricante para células em cultura. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e 1µg de RNA total para a síntese do cDNA fita simples de acordo com os dados do fabricante utilizando o kit Illustra™ Ready-to-Go™ RT-PCR Beads (GE Healthcare) , utilizado para as análises posteriores.

4.6.2. – PCR em tempo real

Para análise de expressão diferencial de genes, 5 pares de oligonucleotídeos iniciadores foram escolhidos por serem referentes a genes que codificam proteínas relacionadas à via de sinalização dependente de IFN- $\alpha\beta$ R e por alguns desses serem específicos de genes pró-apoptóticos. Os

iniciadores foram desenhados utilizando dados da literatura ou através do *software* RTPPrimerDB. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7900 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR[®] Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume das reações foi de 10µL, contendo 5µl de SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems), 250nM de cada oligonucleotídeo e 2,5µL da solução contendo cDNA da amostra composta. Amostra de cDNA de camundongos não inoculados também foram analisados na mesma placa de reação. As condições de amplificação utilizadas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. As reações que compreendem a faixa de 95%-105% de eficiência foram utilizadas aceitas para as análises posteriores.

Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi β -actina. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas.

Tabela 1. Seqüência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real

Primer	Seqüência
<i>IP10 F</i>	5' CCTGCCACGTGTTGAGAT 3'
<i>IP10 R</i>	5' TGATGGTCTTAGATTCCGGATTC 3'
<i>IFN-α4 F</i>	5' CCTGTGTGATGCAGGAACC 3'
<i>IFN-α4 R</i>	5' TCACCTCCCAGGCACAGA 3'
<i>IFN-β F</i>	5' AGCTCCAAGAAAGGACGAACAT 3'
<i>IFN-β R</i>	5' GCCCTGTAGGTGAGGTTGATCT 3'
<i>TRAIL F</i>	5' ACCTCAGCTTCAGTCAGCACTTC 3'
<i>TRAIL R</i>	5' TGTAAGTCACAGCCACAGACACAG 3'
β - <i>Actin F</i>	5' AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA 3'
β - <i>Actin R</i>	5' TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT 3'

4.7 Silenciamento gênico do *IRF-3*

A seqüência do transcrito do gene *IRF-3* murino foi obtido através da busca em banco de dados Entrez Nucleotide NCBI GenBank sob o número de acesso BC050882.1. Os programas siRNA Target Finder e siRNA Converter (Ambion®) foram utilizados para o desenho dos oligonucleotídeos utilizados como moldes para a síntese do siRNA. Três regiões do transcrito foram selecionadas para que pelo menos um tenha uma eficiência de silenciamento gênico de 75 a 95%. A síntese dos siRNAs escolhidos foi realizada utilizando o Silencer™ siRNA Costruction Kit (Ambion®). 2 μ g de cada siRNA juntamente com o agente de transfecção FuGene foi utilizado para a transfecção de células Raw 264.7. Após 48 horas da transfecção as células foram estimuladas para a análise da alteração de expressão de genes relacionados ao gene alvo

silenciado. A confirmação do silenciamento gênico e a análise de expressão diferencial de genes foram feitas por PCR em tempo real utilizando oligos específicos. RNA total das amostras foi extraído utilizando o kit Illustra™ RNAspin Mini (GE Healthcare). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e 1 µg de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA fita simples utilizando o kit Illustra™ Ready-to-Go™ RT-PCR Beads (GE Healthcare). As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7900 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. As especificações das reações e a análise de expressão relativa dos transcritos seguem as mesmas já descritas no item 4.6.2.

4.8 Análise de morte celular em baço de animais infectados pela técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*)

Baços de animais 129Sv/Ev e IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} infectados e não infectados foram coletados após duas semanas de infecção, e foram fixados em formol tamponado 10%, desidratados, diafanizados e parafinizados. Secções de 4µm de espessura foram coletadas em lâminas histológicas. Sobre tais cortes histológicos, ensaios de TUNEL foram realizados utilizando o FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric - TdT Enzyme conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram permeabilizadas com 2 mg/ml Proteinase K 1:100 em 10 mM Tris pH 8 por 20 minutos a temperatura ambiente. Peroxidases endógenas foram inativadas utilizando

H₂O₂ 30% diluída em metanol 1:10 por 5 minutos a temperatura ambiente e a marcação foi, então, realizada. As amostras foram equilibradas em 1X TdT *Equilibration Buffer* por 30 minutos a temperatura ambiente e, após retirar o tampão de equilíbrio, foi adicionado 60µl of TdT *Labeling Reaction Mixture* por amostra e as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 90 minutos. Para parar a reação 100µL da *Stop Solution* foi adicionada por amostra e as lâminas foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Para a detecção dos corpos apoptóticos, 100µL do *Blocking Buffer* foi adicionado por amostra à temperatura ambiente seguindo-se de 5 minutos de incubação. Em seguida 100µL do conjugado 1X foi adicionado por amostra e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram cobertas com 100µL da solução DAB e incubadas por 15 minutos. Após lavar as lâminas em dH₂O, 100µL de solução de contra-coloração por amostra. Após novas lavagens para retirar o excesso de corante, as lâminas foram preparadas para posterior análise em microscópio óptico. Foram fotografadas 50 imagens por lâmina e o índice apoptótico foi medido pela contagem do número de células TUNEL positivas dividido pelo número total de células presentes nos campos fotografados.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos através dos ensaios de ELISA, da contagem de UFC do baço dos camundongos e do PCR em tempo real foram analisados usando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc), através do teste *t* de

Student ou one-way ANOVA com pós-teste de Turkey, sendo considerado significativas as análises com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Brucella abortus* induz a expressão de *IFN-β*

Interferon do tipo I tem um papel central na ativação de uma resposta imunológica celular do hospedeiro ativando sinais intracelulares capazes de inibir infecções virais. Uma vez que a indução dessas citocinas tem sido relatada em resposta a infecção por várias bactérias intracelulares como *Chlamydia pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* e em alguns membros do gênero *Mycobacterium*, macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos selvagens 129Sv/Ev e C57BL/6 foram estimulados com a bactéria *B. abortus* S2308 e o nível de expressão de *IFN-β* ou *IFN-α4* foram mensurados por PCR em tempo real (Figura 6).

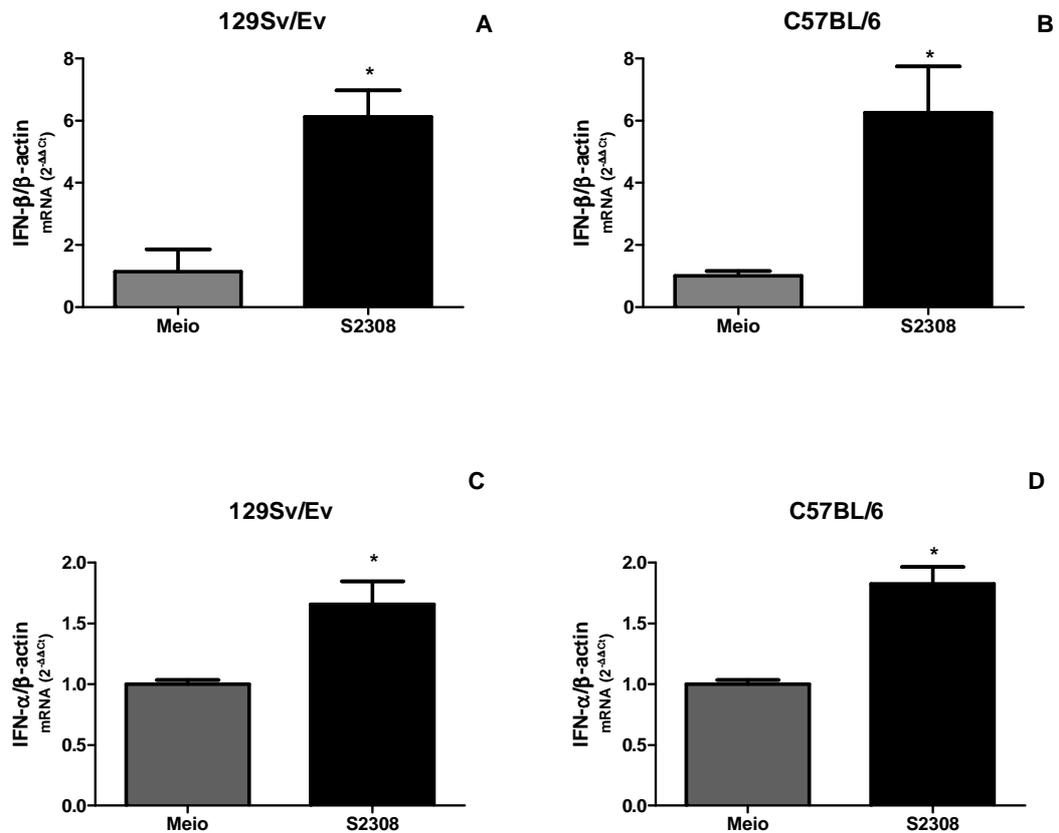


Figura 6. *B. abortus* induz a expressão de interferon do tipo I em BMMØs de camundongos 129Sv/Ev ou C57BL/6. Expressão de *IFN-β* em BMMØs de camundongos 129Sv/Ev (A) ou C57BL/6 (B). Expressão de *IFN-α4* em BMMØs de camundongos 129Sv/Ev (C) ou C57BL/6 (D).

Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ em relação ao tratamento “meio”.

Foi observado um aumento relativo de *IFN-β* tanto nos BMMØs derivados de camundongos 129Sv/Ev quanto nas células derivadas de C57BL/6 quando comparados com o nível de expressão dos transcritos dessa citocina nas células não estimuladas. O nível de expressão de *IFN-α4* também foi estatisticamente maior quando comparado ao nível de tal transcritos em células não estimuladas. Contudo, o nível de expressão de *IFN-α4* não foi tão proeminente quando comparado ao aumento relativo de *IFN-β*. Logo, *IFN-β* foi escolhido como o interferon do tipo I para seguir como marcador da expressão

relativa desta citocina nos experimentos seguintes. Tal resultado inclui *B. abortus* como mais uma bactéria Gram-negativa capaz de induzir *IFN-β* transcricionalmente. As bactérias Gram-negativas capazes de induzir interferon do tipo I mais citadas incluem *Salmonella typhimurium*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psitacci*, *Shigella flexneri* e *Legionella pneumophila* (Decker *et al.*, 2005). Tais bactérias ao induzirem o sistema de interferon do tipo I ativa as células do hospedeiro induzindo efeitos protetores como a produção de *IFN-γ* ou reduzindo o processo invasivo destas bactérias em células não infectadas.

5.2. Camundongos deficientes para o receptor de interferon do tipo I (*IFN-αβR^{-/-}*) apresentam um fenótipo de maior resistência à infecção por *B. abortus*

A indução de interferon do tipo I seguida da sinalização dependente do receptor de interferon do tipo I (*IFN-αβR*), durante a infecção por algumas bactérias intracelulares, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, leva a um efeito prejudicial ao hospedeiro (Decker *et al.*, 2005). Para avaliar a contribuição do receptor de interferon do tipo I (*IFN-αβR*) na estimulação da transcrição e expressão de *IFN-β*, BMMØs provenientes de camundongos *IFN-αβR^{-/-}* e do seu controle selvagem 129Sv/Ev foram estimulados com *B. abortus* S2308 e o nível de produção dessa citocina foi avaliado por ELISA. Como pode ser observado na Figura 7A, *IFN-β* foi induzido e teve seu nível de produção aumentado durante os tempos analisados (24, 48 e 72 horas após estimulação). É possível observar que o camundongo deficiente para o *IFN-αβR* apresentou uma maior disponibilidade da citocina no sobrenadante das

culturas estimuladas quando comparada à citocina presente no sobrenadante das células de 129Sv/Ev. A diferença da concentração de IFN- β observada nos sobrenadantes das culturas de BMM \emptyset s pode ser devido a uma compensação na produção dessa citocina nos camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}, já que os mesmos não possuem um sistema de sinalização mediado pelo IFN- $\alpha\beta$ R. Outra interpretação para uma menor quantidade de IFN- β obtida no sobrenadante dos camundongos selvagens pode ser devido à interação desta citocina com o IFN- $\alpha\beta$ R, diminuindo a sua presença em aproximadamente três vezes no sobrenadante da cultura de BMM \emptyset s nos tempos 48 e 72 horas após o estímulo. Para determinar o nível de controle da expressão dessa citocina e descartar a idéia de que a ausência do receptor nas células analisadas acarretam em maior quantidade de IFN- β disponível no sobrenadante por não estarem associadas ao seu receptor cognato, RNA total de baço dos animais IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} ou 129Sv/Ev infectados com *B. abortus* foi extraído para análise da expressão dessa citocina por PCR em tempo real. Nas duas linhagens de animais analisados, IFN- β foi induzido transcricionalmente (Figura 7B). Pode-se observar que a maior quantidade da citocina disponível no sobrenadante dos animais IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} correlaciona com a maior quantidade de transcritos disponíveis. Este resultado sugere que a ausência do receptor de interferon do tipo I acarreta em uma maior dificuldade das células dos camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} em controlar a expressão de IFN- β através de um processo de *feedback* negativo no processo de infecção pela *B. abortus*. Tal resultado comprova que *B. abortus* é capaz de induzir IFN- β de maneira independente da presença do IFN- $\alpha\beta$ R.

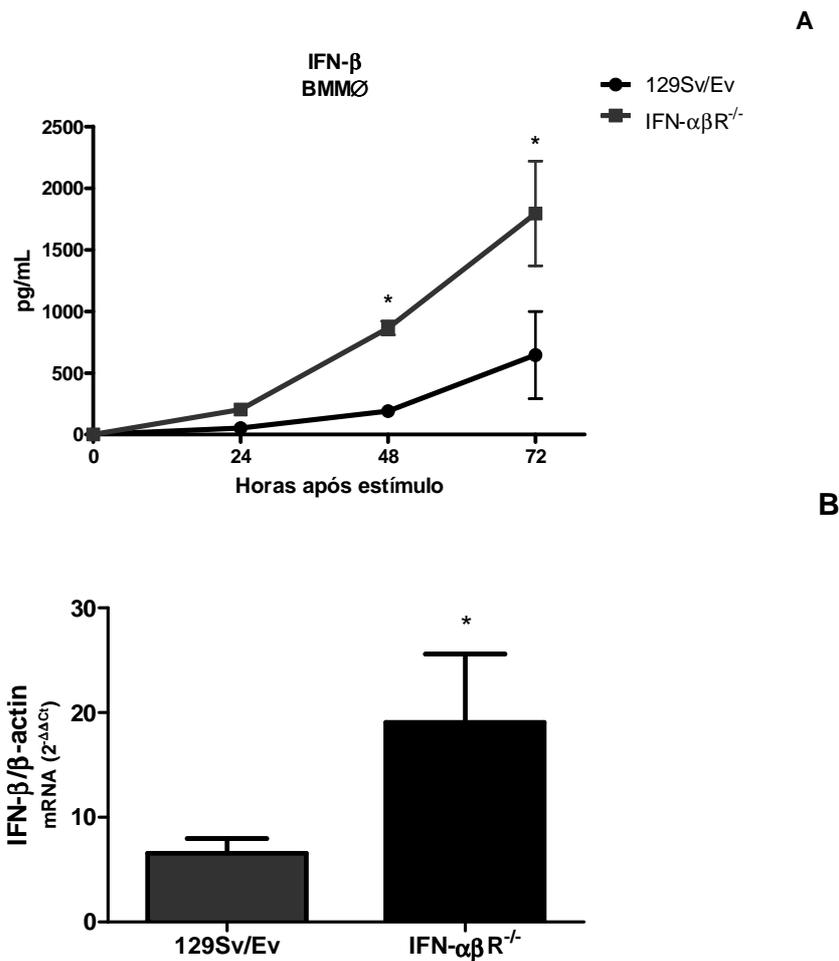


Figura 7. IFN-αβR^{-/-} induz maior expressão de IFN-β ao ser infectado com *B. abortus* quando comparado ao 129Sv/Ev.

Maior quantidade de IFN-β foi detectado no sobrenadante de BMMØs de camundongos IFN-αβR^{-/-} quando comparados às células provenientes de camundongos 129Sv/Ev quando estimuladas com *B. abortus* (A). O maior nível de expressão transcricional de IFN-β em baço de animais IFN-αβR^{-/-} infectados com *B. abortus* (B), reflete a ausência de um controle de feedback negativo dependente do IFN-αβR. (*)p<0,05 em relação ao camundongo selvagem 129Sv/Ev.

O nível de IFN-α também foi monitorado tanto em sobrenadante de culturas de BMMØs estimuladas com *B. abortus* quanto no baço de animais infectados com a bactéria (Figura 8). Camundongos IFN-αβR^{-/-} não apresentaram produção de IFN-α no sobrenadante de BMMØs estimulados com a bactéria. Em camundongos 129Sv/Ev observou-se um aumento seguido

de uma diminuição gradativa dessa citocina. (Figura 8A). O resultado corrobora com os dados de análise de PCR em tempo real para *IFN-α*, onde é possível observar que não há indução da expressão desse gene em células do baço de camundongos infectados com *B. abortus* (Figura 8B).

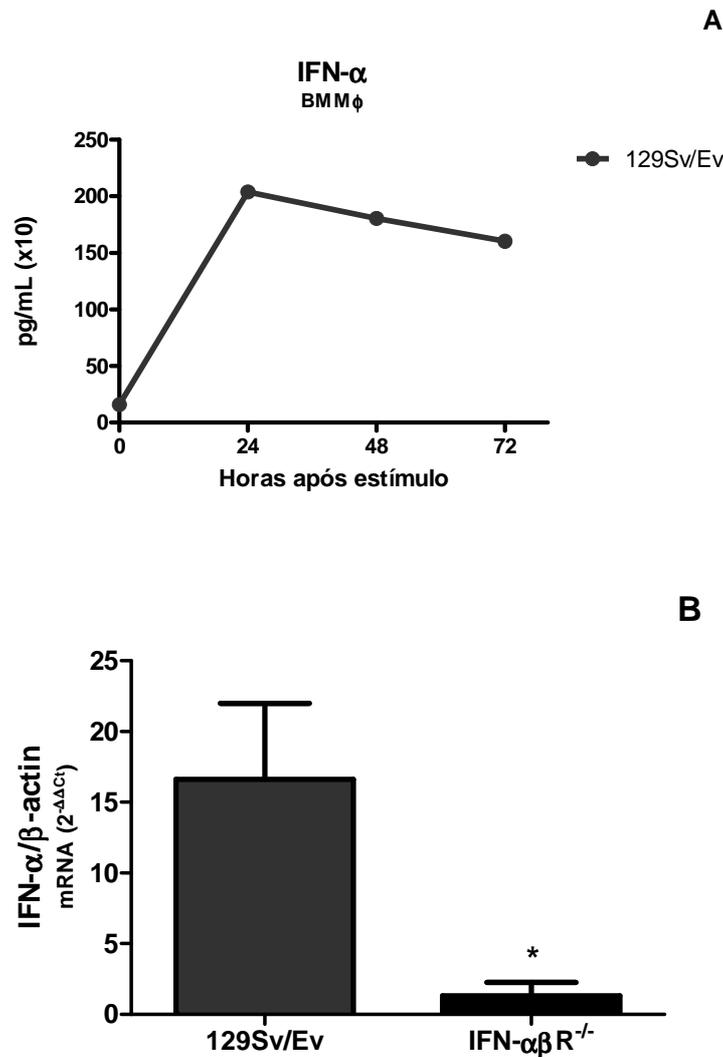


Figura 8. IFN-αβR^{-/-} não é capaz de induzir a expressão de IFN-α ao ser infectado com *B. abortus*.

IFN-α somente foi detectado no sobrenadante de BMMφs de camundongos 129Sv/Ev quando estimuladas com *B. abortus* (A). O nível de expressão transcricional de IFN-α em baço de animais infectados com *B. abortus* somente foi observado em 129Sv/Ev (B). (C) A ativação de interferon do tipo I por *B. abortus* ou pelo seu DNA purificado é capaz de induzir a ativação da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I como observado pela fosforilação de STAT1-Tyr701 (*)p<0,05 em relação ao camundongo selvagem 129Sv/Ev.

Para avaliar a contribuição *in vivo* do receptor de IFN- $\alpha\beta$ R na resposta imunológica contra a *B. abortus*, uma vez que esta bactéria é capaz de ativar o sistema de interferon do tipo I, o número de bactérias viáveis nos baços desses animais foi monitorado nas duas primeiras semanas após infecção. Nenhuma alteração no fenótipo foi observada uma semana após a infecção quando comparados os grupos de camundongos analisados (Figura 9A). Notoriamente, o número de UFC da *B. abortus* mostrou-se diminuída na segunda semana após a infecção, em camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}, comparado aos animais do grupo controle (Figura 9B). Camundongos deficientes para IFN- $\alpha\beta$ R apresentaram uma maior resistência à *B. abortus* quando comparados ao grupo 129Sv/Ev demonstrado por uma menor recuperação de bactérias no baço desses animais. Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} apresentaram uma média de 6,9 logs de unidades formadoras de colônia enquanto camundongos 129Sv/Ev apresentaram uma média de 7,25 logs de UFC, demonstrando que a sinalização mediada por IFN- $\alpha\beta$ R está relacionada com a alteração da habilidade do hospedeiro em controlar ou de eliminar de maneira mais eficiente a infecção pela *B. abortus*. É possível observar ainda uma diminuição na quantidade de bactérias recuperadas nos dois grupos de camundongos analisados. Na primeira semana, camundongos 129Sv/Ev apresentaram uma média de aproximadamente 8,04 logs de UFC caindo para 7,3 logs de UFC na segunda semana após a infecção. Esta diferença foi de aproximadamente 0,74 logs de UFC, enquanto camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} apresentaram na primeira e segunda semanas após a infecção 7,9 e 6,9 logs de UFC respectivamente, acarretando em uma diminuição de aproximadamente 1 log de UFC.

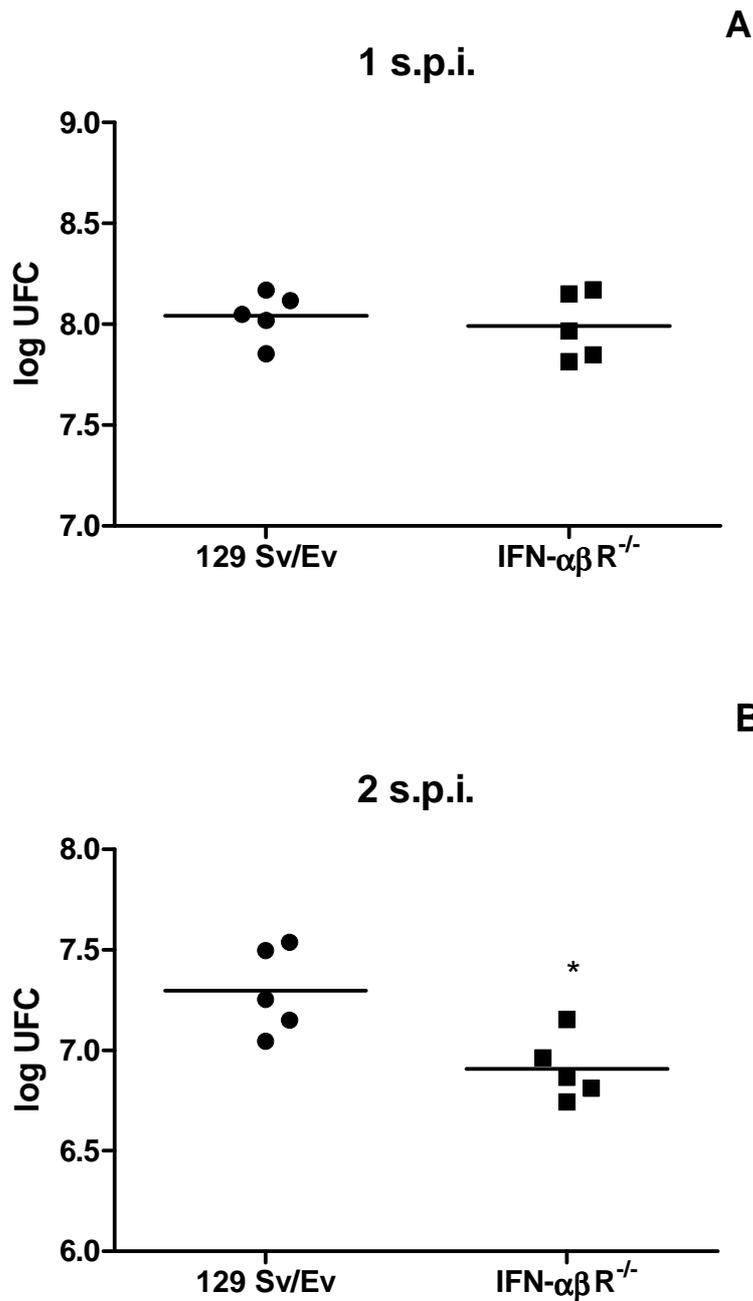


Figura 9. Camundongos deficientes para o receptor de interferon do tipo I têm um aumento na capacidade de controlar a infecção por *B. abortus*.

Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} (n=5), e 129Sv/Ev (n=5), foram infectados intraperitonealmente com 10⁶ bactérias e 2 semanas após a infecção o título de *B. abortus* foi analisado no baço desses animais e apresentados em log de CFU. Os dados representam 3 experimentos independentes. (*)p<0,05 em relação ao camundongo selvagem 129Sv/Ev.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com os dados obtidos pelos grupos que analisaram camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} infectados com *L.*

monocytogenes, onde o fenótipo encontrado é de resistência devido a um aumento na habilidade dos camundongos em controlar a infecção bacteriana quando não há a sinalização mediada pelo IFN- $\alpha\beta$ R (O'Connell *et al.*, 2004; Auerbach *et al.*, 2004; Carrero *et al.*, 2004). Os camundongos deficientes para o IFN- $\alpha\beta$ R infectados com *L. monocytogenes* apresentaram um título de bactérias recuperadas do fígado desses animais 10^2 - 10^3 menor quando comparada a quantidade de bactérias recuperadas em camundongos selvagens. No modelo de infecção por *Chlamydia muridarum*, camundongos deficientes para o IFN- $\alpha\beta$ R também apresentaram maior resistência à infecção por essa bactéria quando comparados aos camundongos selvagens para o receptor. A suscetibilidade dos camundongos selvagens foi relacionada à indução de interferon do tipo I culminando com a ativação transcricional de genes pró-apoptóticos em macrófagos presentes no infiltrado pulmonar (Qiu *et al.*, 2008). Contudo, existem outros modelos de infecção bacteriana como infecção por *Legionella pneumophila*, *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium bovis* nos quais a indução de interferon do tipo I tem funções protetoras suprimindo a invasão bacteriana pelo aumento da produção de IFN- γ e NO (Schiavoni *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2004; Kuchtey *et al.*, 2006).

Outra evidência de bactéria capaz de induzir níveis elevados de interferon do tipo I no hospedeiro foi demonstrada por Manca e colaboradores (2001). Este grupo mostrou que estirpes hipervirulentas de *Mycobacterium tuberculosis* foram capazes de induzir altos níveis de IFN- α e que camundongos infetados com esta bactéria morriam rapidamente devido a incapacidade de induzir uma resposta Th1 eficiente. Ademais, a co-administração de interferon do tipo I acarretava no aumento da taxa de

replicação da bactéria em macrófagos mesmo com a co-administração de IFN- γ .

A indução de uma resposta imune do tipo Th1 é considerada como a resposta celular mais importante no controle da infecção por *B. abortus*. Dentre as citocinas envolvidas no padrão de uma resposta inflamatória, IL-12 é chave no direcionamento de uma resposta Th1 culminando com a produção de IFN- γ . O controle da brucelose murina é dependente da indução de IFN- γ , e TNF- α tem papel crucial na eliminação da *Brucella* presente em macrófagos (Zhan *et al.*, 1996). Para investigar a produção e a relação destas citocinas na resposta à infecção por *B. abortus* tanto em camundongos 129Sv/Ev quanto em camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}, cultura de células do baço de animais infectados foram estimuladas com a bactéria viva. Concordante com a maior resistência dos camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}, os níveis de IFN- γ e NO no sobrenadante da cultura de esplenócitos derivados deste camundongo foram maiores quando comparados à disponibilidade desta citocina no sobrenadante de esplenócitos de camundongos 129Sv/Ev (Figura 10A e 10C). Este resultado sugere que o aumento da produção de IFN- γ e de NO pode estar relacionado ao aumento da resistência de animais IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} à infecção em relação aos camundongos 129Sv/Ev.

O papel de IL-12 produzida por BMM ϕ s também foi avaliada para o entendimento da diferença de fenótipo observado em camundongos 129Sv/Ev e IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}. Como esperado, a bactéria foi capaz de induzir a produção de IL-12 em BMM ϕ s proveniente de ambos os tipos de animais. Entretanto, assim como observado para a produção de IFN- γ células extraídas de animais IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} produziram níveis maiores de IL-12 que as células de animais 129Sv/Ev.

Estes resultados sugerem, então, que um dos possíveis mecanismos relacionados à maior resistência à infecção por *B. abortus* observada em animais IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} se deve ao aumento da produção de IFN- γ em consequência da maior produção de IL-12 por células da imunidade inata.

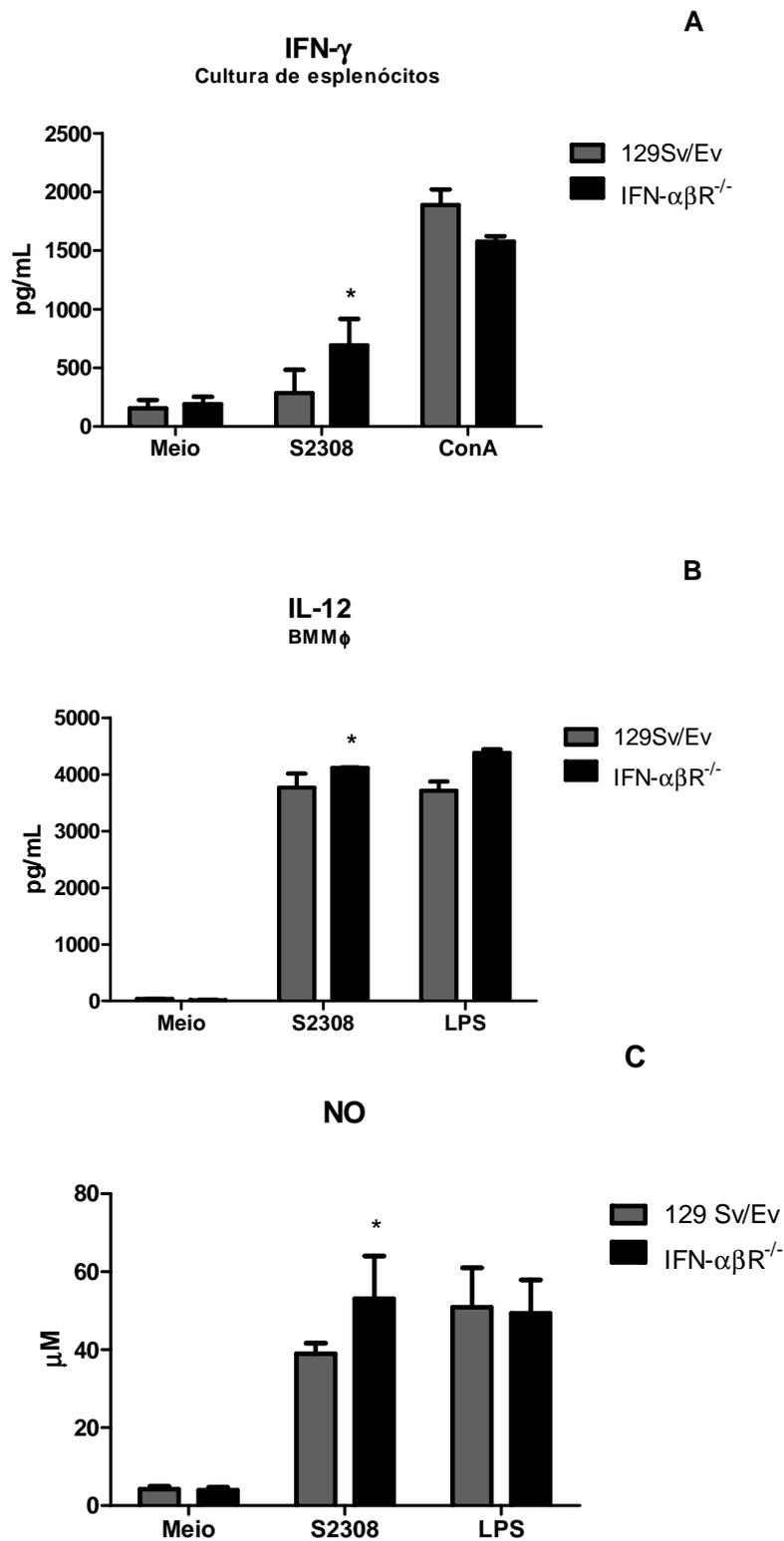


Figura 10. Células de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} produzem maior quantidade de IL-12, IFN- γ e NO quando estimuladas com *B. abortus*.

Produção de IFN- γ e NO por esplenócitos de camundongos 129Sv/Ev ou IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} infectados com a *B. abortus* S2308, após estimulação com *B. abortus* S2308 (A e C) e produção de IL-12 por BMM ϕ s provenientes dos dois tipo de camundongos analisados (B). Os resultados são representativos de três experimentos independentes. (*)p<0,05 em relação ao camundongo selvagem 129Sv/Ev.

5.3 *B. abortus* induz morte celular esplênica

Um dos efeitos da indução de interferon do tipo I é a ativação de um grupo de genes pró-apoptóticos que apresentam grande capacidade de inibir o ciclo de infecção viral. Diferentes tipos de morte celular são definidos por critérios morfológicos classificando tais mortes como apoptose ou necrose. Enquanto critérios baseados em características enzimáticas incluem o envolvimento de diferentes classes de proteases e nucleases (Galluzzi *et al.*, 2007).

Foi sugerido que a apoptose de linfócitos e macrófagos no baço pode ser considerado o principal mecanismo para o aumento de suscetibilidade à infecção de bactérias intracelulares. Bactérias intracelulares patogênicas como *Chlamydia* e *Rickettsia* dependem da manutenção da integridade celular do hospedeiro para uma replicação eficiente. Contudo, a morte celular induzida por essas bactérias garante o acesso a tecidos mais internos do organismo hospedeiro (Böhme e Rudel, 2009). De maneira contrária, *Anaplasma phagocytophilum* possui a habilidade de atrasar a apoptose, principalmente em neutrófilos, por várias horas ou dias até completar o seu ciclo de replicação (Ge e Rikihisa, 2006). Assim, para analisar se a maior resistência observada em camundongos $\text{IFN-}\alpha\beta\text{R}^{-/}$ está relacionado à diminuição de uma sinalização eficiente para a indução de genes relacionados ao processo de morte celular programada, camundongos 129Sv/Ev e $\text{FN-}\alpha\beta\text{R}^{-/}$ foram infectados com *B. abortus* S2308 e duas semanas após a infecção, o baço destes camundongos foram retirados para análise de morte celular pela técnica de TUNEL. Como observado na Figura 11A, células TUNEL positivas podem ser observadas nos

cortes provenientes de baços de animais infectados através da presença de pontos enegrecidos comparados com os cortes de baços de camundongos tratados com PBS, sugerindo que a bactéria é capaz de induzir apoptose neste tecido. Entretanto, uma menor quantidade de células TUNEL positivas foi observada em camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}. Para uma análise quantitativa da morte celular observada, o índice de morte celular foi avaliado através da contagem do número de células TUNEL positivas dividindo pelo valor pelo número total de células por fotografia. O coeficiente de variação (CV) foi verificado nas amostras provenientes de camundongos 129Sv/Ev e IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} infectados com a bactéria. As imagens foram numeradas de 1 a 50 e de maneira aleatória o índice CV foi medido de 5 em 5 até a avaliação das 50 imagens coletadas dos tratamentos utilizados como padrão para a avaliação. A avaliação de 20 imagens de forma aleatória foi suficiente para que o CV se tornasse constante. A partir desta análise, os tratamentos com a bactéria tiveram o índice avaliado novamente e o índice dos tratamentos com PBS foi avaliado a partir de 20 imagens. O índice de morte celular confirma os dados das análises histológicas mostrando que camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}, apresentam uma menor taxa de morte celular esplênica quando comparado aos camundongos selvagens. É interessante observar que o índice de morte celular dos camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} quando infectados com a bactéria não apresentam diferença quando comparados ao grupo controle que recebeu PBS, sugerindo que a falta da sinalização dependente do receptor de interferon do tipo I está envolvida na morte celular induzida por *B. abortus*.

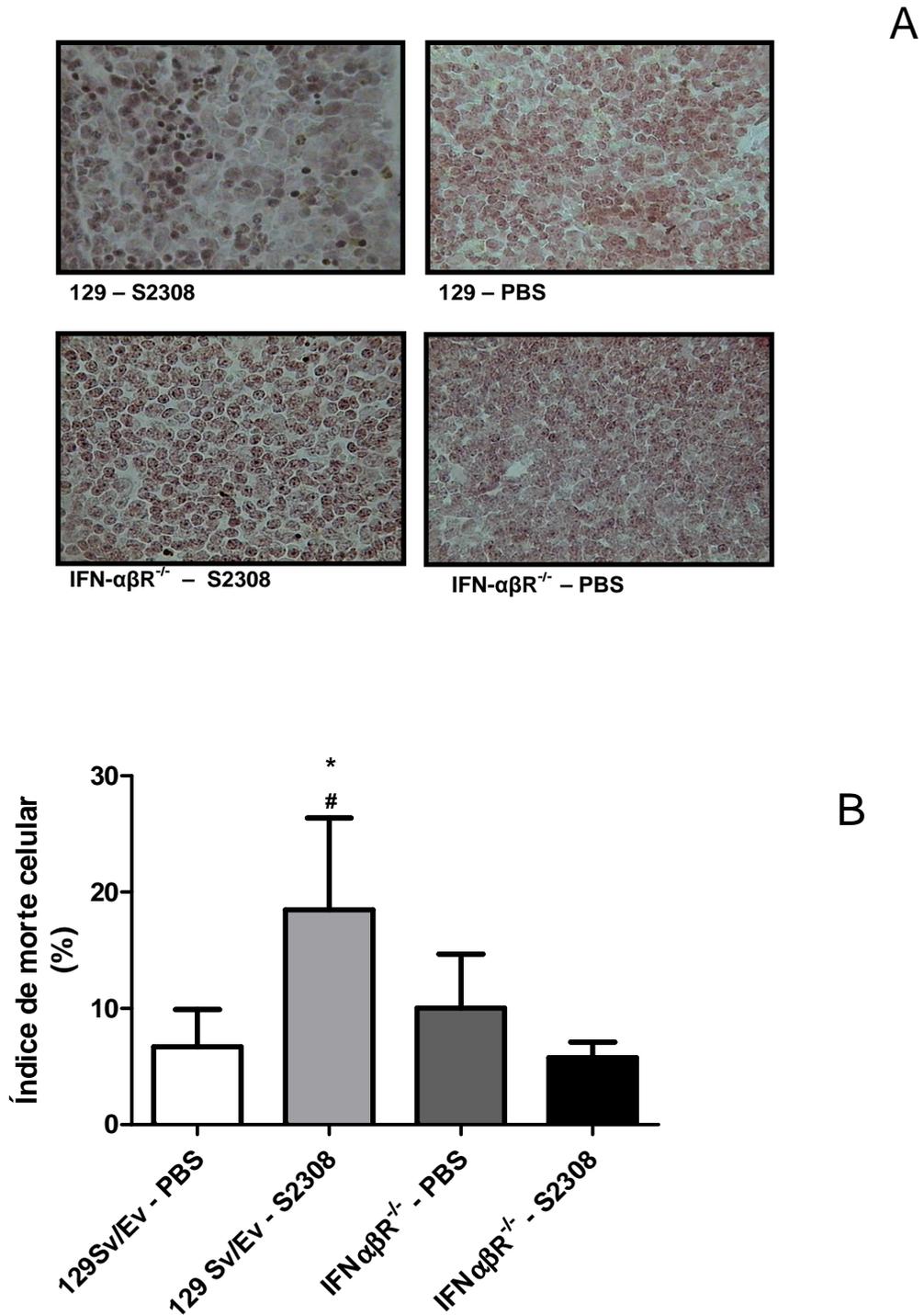


Figura 11. *B. abortus* induz morte celular esplênica dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I.

Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} (n=5), e 129Sv/Ev (n=5), foram infectados intraperitonealmente com 10⁶ bactérias e 2 semanas após a infecção o baço desses animais foi utilizado para análise de TUNEL. (A) Cortes histológicos após reação de TUNEL. Objetiva:40X (B) Índice de morte celular calculado a partir de imagens obtidas de cortes histológicos após reação de TUNEL (*)p<0,05 em relação ao tratamento 129Sv/Ev - PBS. (#)p<0,05 em relação ao tratamento IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} - S2308.

Vários relatos foram feitos avaliando o perfil de modelos de infecção bacteriana onde a morte celular está relacionada a um processo efetivo de patogênese (Böhme e Rudel, 2009). Dentre eles é possível distinguir aqueles em que a bactéria ativa o processo de morte celular programada daqueles onde a bactéria inibe o aparato celular responsável pelo desencadeamento do processo de morte. A maioria dos estudos apontam para um processo inibitório de apoptose celular através da modulação de componentes do aparato celular associado ao desencadeamento do processo de morte, como é o caso das proteínas da família Bcl-2 que controlam a integridade da mitocôndria e das proteínas efetoras do processo de apoptose, as caspases. Dentre as bactérias relacionadas ao processo de inibição do processo apoptótico estão *Chlamydia*, *Legionella*, *Coxiella* e *Rickettsia* (Paland *et al.*, 2006; Banga *et al.*, 2007; Voth *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2004).

Dentre os processos em que há ativação de caspases através de fatores de virulência associados aos patógenos, *Shigella*, *Salmonella* e *Listeria* são as bactérias mais estudadas na ativação de caspase-1 de um inflamossomo controlando a clivagem catalítica das formas inativas de IL-1 β e IL-18 para suas formas ativas em um processo recentemente descrito como piroptose (Muruve *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008). Células em processo piroptótico possuem características bioquímicas e morfológicas tanto do processo apoptótico quanto do processo de necrose celular (Bergsbaken *et al.*, 2009). Como no processo apoptótico, células em piroptose sofrem degradação do DNA e condensação nuclear, mas não ocorre a fragmentação internucleossomal como observado no caso de um processo apoptótico. Logo, a técnica de TUNEL não pode ser

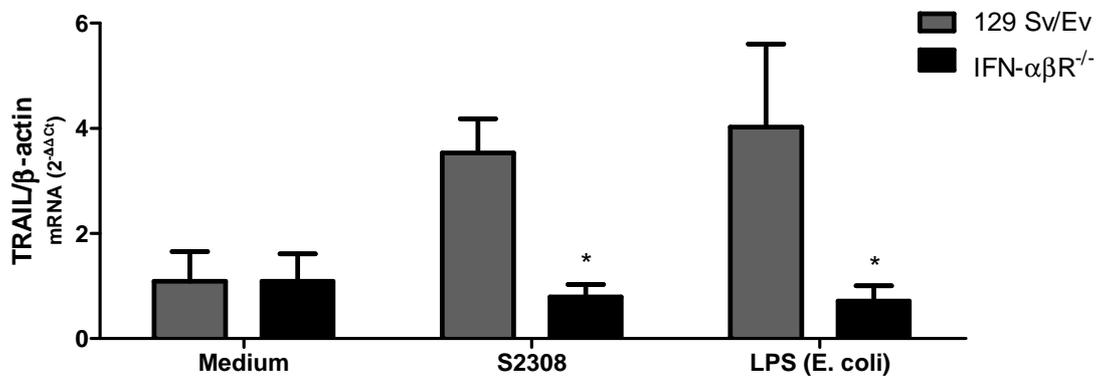
utilizada como forma de tentar distinguir o tipo de morte celular que a célula infectada está, já que a técnica é baseada na adição de nucleotídeos marcados nas porções 3' terminais de DNA em estado de fragmentação. Sendo assim, podemos associar a presença de células TUNEL positivas em baços de animais infectados com a indução de uma morte celular pela *B. abortus* de maneira dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I.

5.4. TRAIL é induzido pela sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I após a infecção por *B. abortus*

Dentre o grupo de genes regulados por interferon (IRGs), genes pró apoptóticos estão entre os regulados por interferon do tipo I. Como os resultados de TUNEL sugerem um processo de morte celular dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I, foi analisado o perfil de expressão do gene pró-apoptótico TRAIL por PCR em tempo real em células estimuladas com *B. abortus* e em células do baço de animais infectados. BMMØs de camundongos 129Sv/Ev e de IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} foram infectados com *B. abortus* S2308 o nível de expressão de TRAIL foi avaliado 24 horas após a infecção. Foi observado que o estímulo foi capaz de induzir transcricionalmente TRAIL em camundongos 129Sv/Ev e que esta indução é dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I (Figura 12A). Em BMMØs de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} não houve indução da expressão de TRAIL. Concordante com os resultados anteriores onde foi mostrado que tanto *B. abortus* S2308 foi capaz de induzir interferon do tipo I, este estímulo também acarreta na indução de TRAIL, um dos genes que é

regulado por interferon do tipo I dependentes do IFN- $\alpha\beta$ R. Para confirmar os dados *in vitro*, a expressão de TRAIL foi analisada também em células de baço de camundongos infectados por *B. abortus* S2308. Os dados de PCR em tempo real a partir do cDNA obtido destes baços mostraram que a expressão de TRAIL é dependente do IFN- $\alpha\beta$ R devido a não indução deste gene em animais deficientes para este receptor quando comparado à indução observada em baço de camundongos 129Sv/Ev (Figura 12B).

A



B

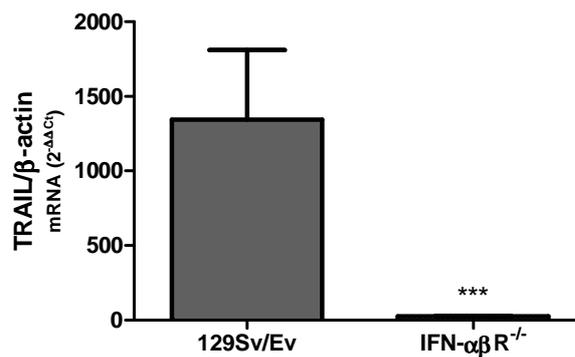


Figura 12. *B. abortus* induz a expressão de TRAIL dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I.

(A) BMMØs de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} e de camundongos 129Sv/Ev estimulados com *B. abortus* ou o DNA purificado desta bactéria e o RNA total foi extraído para análise de expressão gênica de TRAIL. (B) Análise de expressão diferencial gênica de TRAIL em baço de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} (n=3), e 129Sv/Ev (n=3), a 2 semanas após serem infectados intraperitonealmente com 10⁶ bactérias.

5.5. A indução da expressão de *IFN-β* pela infecção por *Brucella abortus* é dependente de IRF-3

A ativação de IRF-3 está à jusante da sinalização mediada por TLRs que utilizam TRIF como molécula adaptadora para a indução de *IFN-β*, ademais IRF-3 também pode ser utilizado por outros receptores da imunidade inata no reconhecimento e desencadeamento de uma sinalização que culmina com a expressão de *IFN-β* (Figura 13). Alguns receptores são capazes de reconhecer PAMPs de vírus, como RIG-I ou MDA5 e, recentemente, foi descrito um receptor capaz de reconhecer DNA de várias fontes, inclusive bacteriano, e denominado de DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* – Takaoka *et al.*, 2007).

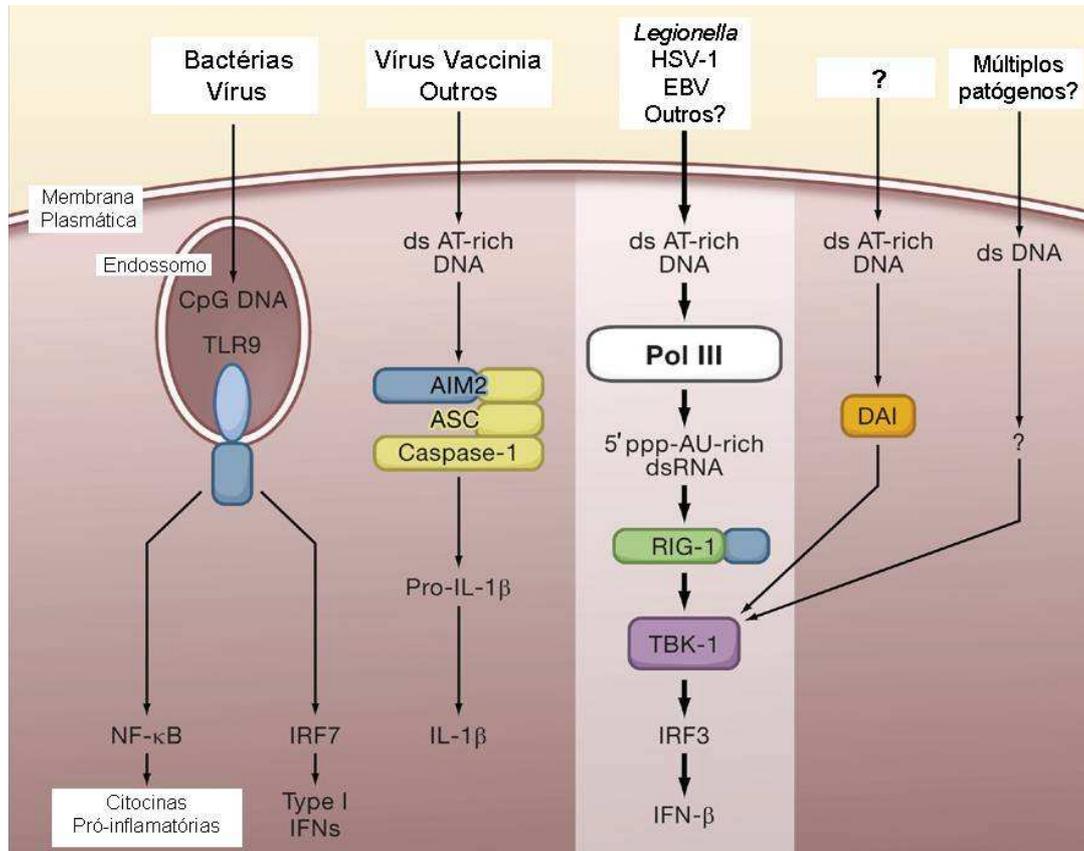


Figura 13. Papel central de IRF-3 na indução de interferon do tipo I através da sinalização mediada por vários receptores da imunidade inata.

Após o reconhecimento de ácidos nucleicos de patógenos por receptores da imunidade inata, uma cadeia de transdução de sinais culmina com a ativação de IRF-3 que atua como ativador transcricional de *IFN-β*. Adaptado de O'Neill, 2009.

Para verificar a contribuição de IRF-3 na indução de *IFN-β* por *B. abortus*, a função biológica desta molécula foi analisada quando silenciada em células RAW 264.7. Três regiões do transcrito de *IRF-3* foram selecionados para serem alvos de siRNAs. Contudo somente a construção denominada si1075 teve a capacidade de interferir na expressão de *IRF-3* em aproximadamente 50% das células estudadas (Figura 14A). Apesar da interferência ter sido relativamente baixa quando comparada ao proposto pela seleção das sequências pelo programa utilizado para o desenho dos iniciadores, tal interferência foi capaz de reduzir drasticamente a expressão de

IFN-β, se mostrando um ótimo alvo para análise de genes induzidos pelo ativador transcricional IRF-3 (Figura 14B). Quando estimuladas com *B. abortus* as células silenciadas apresentaram uma drástica redução da expressão de *IFN-β*, indicando que IRF-3 está envolvido na ativação do sistema de interferon do tipo I provavelmente como ativador transcricional do gene *IFN-β*. Tais resultados sugerem que a ativação do sistema de interferon do tipo I por *B. abortus* envolve uma sinalização mediada por um receptor da imunidade inata que necessita da expressão de IRF-3. No caso da indução de interferon do tipo I por *L. monocytogenes*, foi observado um padrão similar ao proposto neste trabalho com *B. abortus*. IRF-3 e TBK1 são essenciais para a ativação do sistema de interferon do tipo I em células estimuladas com *L. monocytogenes*, mas independentes de TLRs e da molécula adaptadora TRIF. Tais resultados suportam que o hospedeiro desencadeia uma via de ativação de interferon do tipo I similar quando infectado com *B. abortus*. É importante ressaltar que células RAW 264.7, quando estimuladas com *B. abortus*, induzem a expressão de *IFN-β* (Figura 14B), sendo então, considerado um bom modelo para estudos da ativação do sistema de interferon do tipo I sob condições de silenciamento gênico.

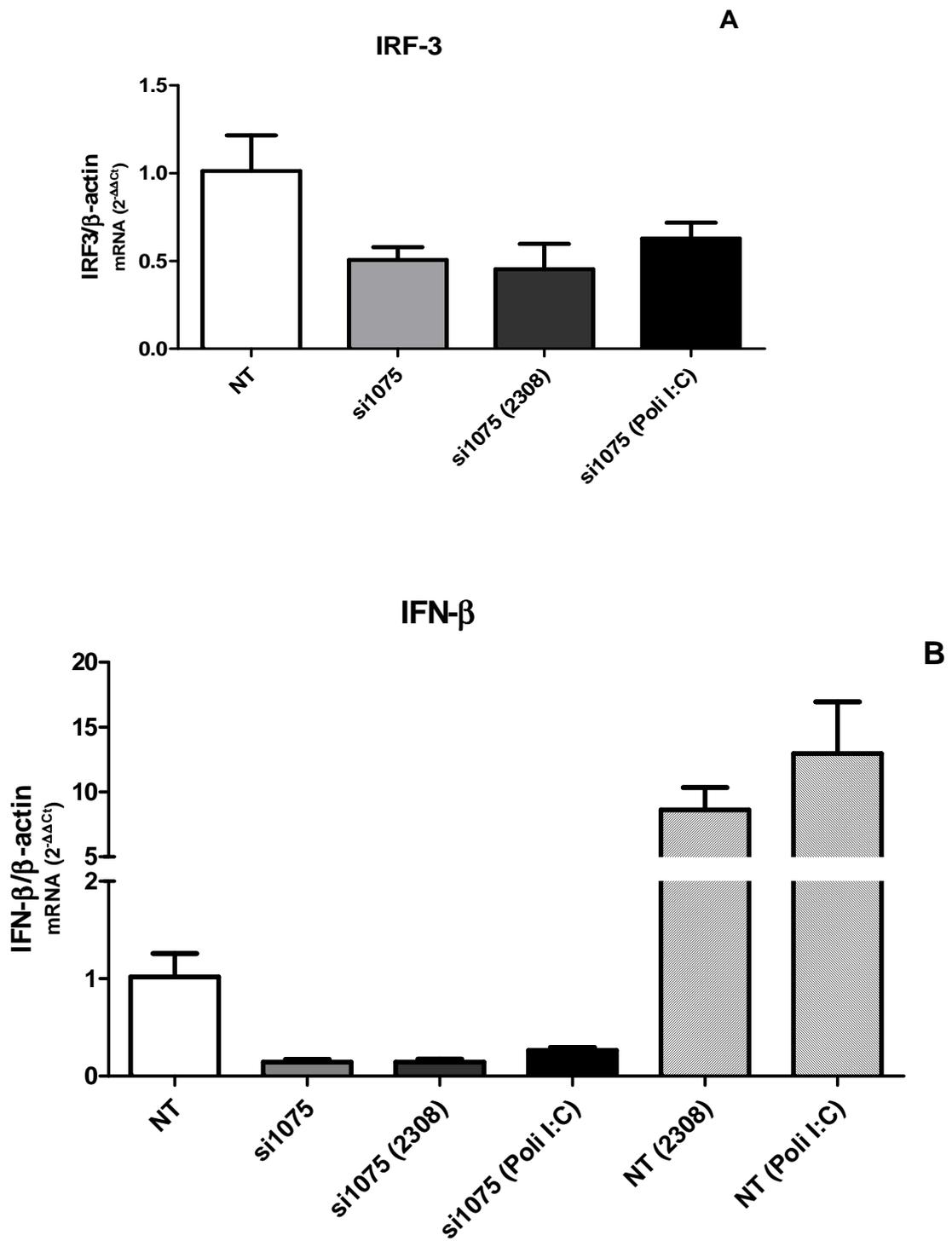


Figura 14. O silenciamento gênico de IRF-3 diminui a expressão de *IFN-β* em células RAW 264.7 quando estimuladas com *B. abortus*.

(A) IRF-3 teve uma diminuição de aproximadamente 50% em células transfectadas com o siRNA si1075. (B) A expressão de *IFN-β* foi diminuída em aproximadamente 90% em células RAW 264.7 IRF-3 silenciadas quando estimuladas com *B. abortus*.

Uma vez que a indução de interferon do tipo I foi dependente da molécula IRF-3, foi avaliada a expressão de TRAIL em células Raw264.7 IRF-3 silenciadas. Como observado na figura 15 pode-se perceber que a expressão de TRAIL é praticamente abolida nas células IRF-3 silenciadas, mostrando, assim, que a indução de *IFN-β* por *B. abortus*, que é dependente de IRF-3, leva a ativação da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I culminando com a expressão de genes pró-apoptóticos como *TRAIL*. Tal mecanismo pode sugerir que o aumento da suscetibilidade a *B. abortus* pode estar associada à indução da morte celular dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I através da indução de genes pró-apoptóticos.

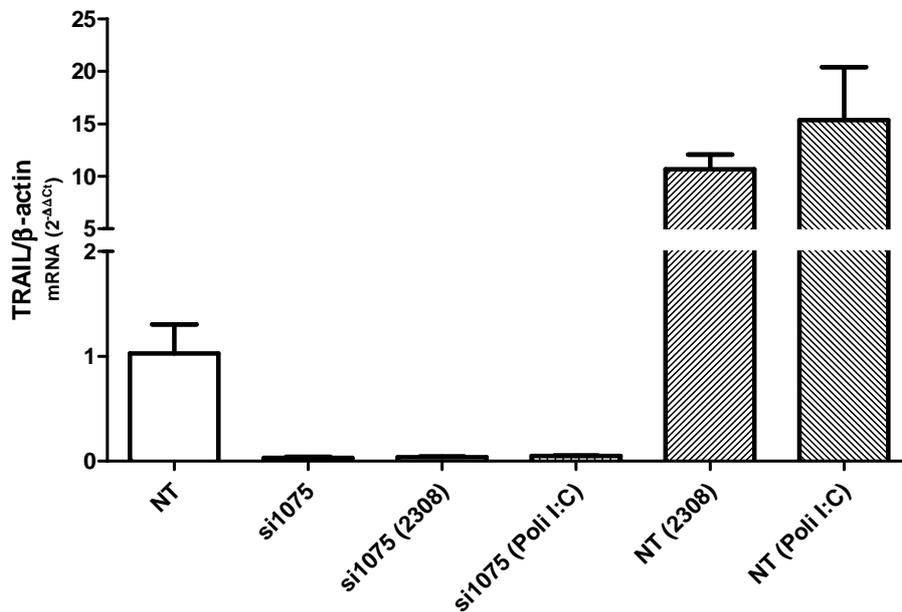


Figura 15. O silenciamento gênico de IRF-3 diminui a expressão de *TRAIL* em células RAW 264.7 quando estimuladas com *B. abortus*.

A expressão de TRAIL foi diminuída em aproximadamente 95% em células RAW 264.7 IRF-3 silenciadas quando estimuladas com *B. abortus*.

5.6. O DNA da *B. abortus* é indutor do sistema de interferon do tipo I

Os ácidos nucléicos de diversos patógenos podem suscitar respostas imunes quando expostos em uma célula infectada. Tanto moléculas de DNAs quanto de RNAs de alguns patógenos têm recebido bastante atenção por serem capazes de influenciar na resposta imune do hospedeiro tanto para uma resposta efetiva quanto para uma resposta patológica (Takaoka et. al, 2007). Além disso, sinalizações intracelulares mediada por receptores da imunidade inata culminam na ativação do ativador transcricional *IRF-3* levando à expressão de interferon do tipo I. Para determinar se o DNA da *B. abortus* tem um papel de agonista na indução de interferon do tipo I mediada por *IRF-3*, BMMØs de camundongos 129 Sv/Ev foram estimulados com o DNA purificado de *B. abortus* ou com o DNA purificado tratado com DNase como controle da estimulação. Foi observado, utilizando PCR em tempo real, que as células estimuladas com o DNA da bactéria foram capazes de aumentar a expressão tanto de *IFN-β* quanto de *IFN-α* (Figuras 16A e 16B). Contudo, o maior aumento de expressão foi observado para *IFN-β* já que no caso de *IFN-α* houve aumento da expressão desse gene também no tratamento com DNA+DNase, não sendo possível associar o aumento da expressão desse gene com a estimulação com o DNA bacteriano. Tais resultados sugerem que o DNA da *B. abortus* pode ser considerado como um agonista de interferon do tipo I, principalmente de *IFN-β* em BMMØs derivadas de camundongos 129Sv/Ev.

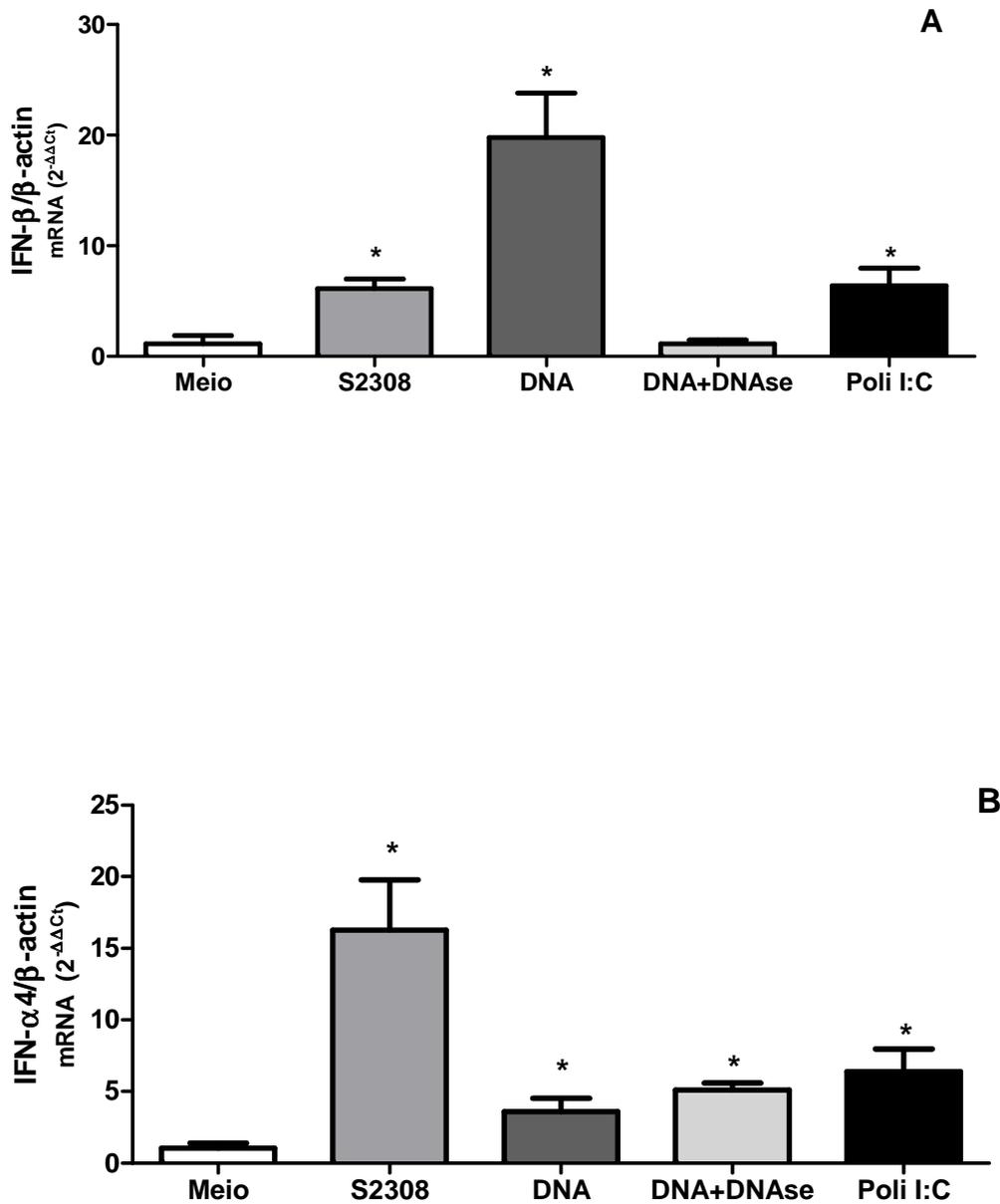


Figura 16. O DNA de *B. abortus* é agonista do sistema de interferon do tipo I. O tratamento de BMMØs com DNA de *B. abortus* induz a expressão transcricional de *IFN-β* (A), e em menor escala a expressão de *IFN-α* (B). (*) $p < 0,05$ em relação ao tratamento “meio”.

Vários estudos têm apontado o DNA ou oligonucleotídeos sintéticos que possuem motivos CpG como uma moléculas que rapidamente estimulam o sistema imune, através da estimulação a proliferação de células B, células T e macrófagos, e indução de várias citocinas imunomodulatórias associados a um

perfil Th1 (Ballas *et al.*, 1996; Halpern *et al.*, 1996; Klinman *et al.*, 1996). Evidências têm indicado a presença de moléculas sensoras citosólicas relacionadas ao reconhecimento de DNA exposto durante um processo infeccioso ou por uma eliminação incompleta de um patógeno acarretando em uma rápida ativação do sistema de interferon do tipo I, como é o caso da molécula nomeada de DAI por Takaoka e colaboradores (2007). Esses pesquisadores propuseram uma função biológica para tal molécula ao analisar o fenótipo de células de fibroblastos silenciadas para a molécula DAI. Foi observado que as células silenciadas não eram capazes de ativar o sistema de interferon do tipo I por não serem capazes de induzir a ativação de IRF-3.

5.7. A indução de *IFN-β* por *B. abortus* é independente de TLR9

Entre os possíveis candidatos a estimular a transcrição de *IFN-β* estão os TLRs3, -4, -5, -7, -8 e -9 (Takeda *et al.*, 2003). TLR9 é considerado o único candidato entre os TLRs descritos acima que reconhece o DNA de *B. abortus* como um padrão molecular associado a esse patógeno. Alguns trabalhos evidenciaram o papel desse receptor no controle da brucelose. Nestes estudos, a brucelose murina se mostrou exacerbada em animais deficientes para o receptor TLR9 quando comparado ao grupo controle, demonstrando a necessidade desta molécula para uma resposta eficiente contra esse patógeno (Macedo *et al.*, 2008). Baseado nestes achados foi avaliado em BMMØs de camundongos deficientes para TLR9 a capacidade de reconhecer e induzir a expressão de *IFN-β*. Como observado na Figura 17, TLR9 não é essencial para a indução de *IFN-β* já que as células provenientes de camundongos deficientes

para esta molécula foram capazes de induzir transcricionalmente *IFN-β* de maneira semelhante aos animais C57BL/6. Este resultado confirma que a indução de *IFN-β* não requer a participação de TLR9 no reconhecimento do DNA purificado de *B. abortus*, sugerindo que outra molécula poderia atuar como receptor do sistema imune inato do hospedeiro capaz de reconhecer o DNA bacteriano e sinalizar através de IRF-3 culminando com a indução do sistema de interferon do tipo I.

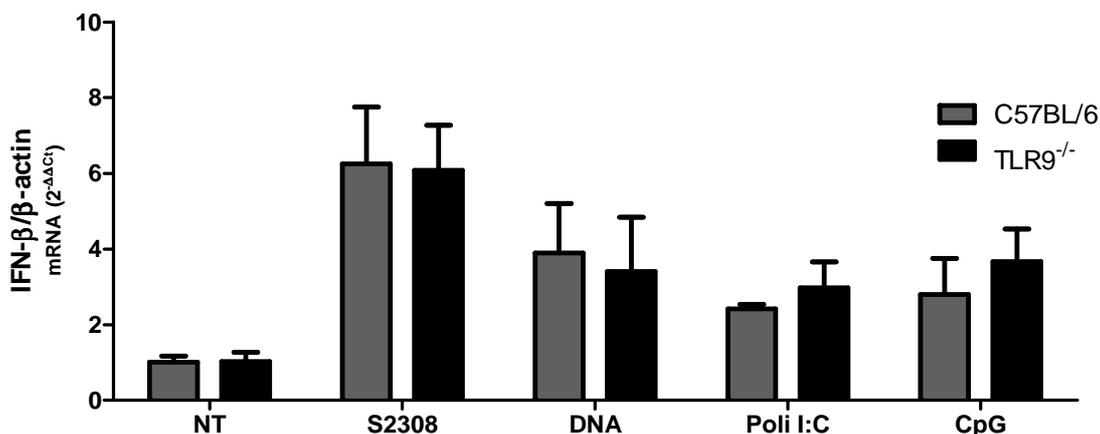


Figura 17. TLR9 não é essencial para a indução de *IFN-β*.

O tratamento de BMMØs com *B. abortus* ou o DNA purificado dessa bactéria induz a expressão transcricional de *IFN-β* independente da ausência de TLR9.

5.8. A indução de *IFN-β* pelo DNA purificado de *B. abortus* é independente de TLR2 ou TLR4

Dentre os TLRs que são capazes de reconhecer PAMPs de *B. abortus* estão TLR2 e TLR4. Apesar de resultados contraditórios serem encontrados na literatura, alguns modelos de resistência a *Brucella* já foram descritos principalmente através da sinalização por TLR4 culminando com a ativação de

NF- κ B (Oliveira *et al.*, 2008; Copin *et al.*, 2007). Contudo, a atuação destes receptores na indução de interferon do tipo I foi demonstrada no modelo de infecção utilizando *Brucella*. Como a indução de interferon do tipo I foi sugerida ser independente de TLR9, BMM ϕ s de camundongos TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} foram extraídos e estimulados com a bactéria viva, ou com o DNA purificado desta bactéria ou, então, com os agonistas destes receptores já reportados na literatura como a proteína lipídada presente na membrana externa de *B. abortus*, L-omp-19 e com o LPS desta bactéria purificado, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 18, os níveis de transcrito de *IFN- β* foi aumentado nos tratamentos com a bactéria viva (S2308), ou com o DNA purificado ou então no controle Poli I:C. Não houve dependência de nenhum dos TLRs analisados para a ativação transcricional de *IFN- β* , excluindo tais receptores como possíveis candidatos à indução de interferon do tipo I por *B. abortus*. TLR4 pode sinalizar em uma via MyD88-independente que culmina com a ativação de *IFN- β* . Assim, este trabalho vem demonstrar que a indução de interferon do tipo I por *B. abortus* é independente da sinalização mediada por TLR4. Outra questão importante neste contexto é a ativação do sistema de interferon do tipo I não é dependente do LPS da *B. abortus*. Uma análise de dose resposta foi feita utilizando concentrações crescentes deste componente bacteriano purificado e ele não foi capaz de induzir a expressão de *IFN- β* mesmo em células de camundongos C57BL/6. Contudo o DNA purificado de *B. abortus* foi capaz de induzir o aumento da expressão de *IFN- β* mesmo na ausência de TLR4 sugerindo mais uma vez que o DNA desta bactéria é um agonista para a indução do sistema interferon do tipo I independente da sinalização mediada por TLR4.

Um ponto crítico na ativação transcricional de genes que codificam interferon do tipo I é a fosforilação de IRF-3 e/ou IRF-7. TRIF utiliza o adaptador TRAF3 para recrutar a cinase TBK1 capaz de fosforilar IRF-3. Na maioria das células a sinalização dependente de MyD88 não leva à indução de interferon do tipo I. Contudo, Barbalat *et al.*, 2009 apresentou recentemente que DNA de vírus é capaz de induzir a expressão de interferon do tipo I dependente da sinalização mediada pelo receptor TLR2 e independente de qualquer outro receptor conhecidamente capaz de reconhecer ácidos nucléicos. Sendo assim, para avaliar se TLR2 está envolvido na ativação do sistema de interferon do tipo I por *B. abortus* ou pelo seu DNA, BMMØs de camundongos TLR2^{-/-} foram estimulados com a bactéria viva ou com seu DNA, assim como com a proteína lipídada L-omp19. L-omp19, mas não sua forma não lipídada, é capaz de induzir a secreção de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12 em um processo dependente de TLR2 (Giambartolomei *et al.*, 2004). Sendo assim, L-omp19 é um agonista de TLR2, mas sua função na indução de interferon do tipo I não havia sido investigada. Como observado na Figura 18 TLR2 não está relacionado à indução da expressão de *IFN- β* . Ademais, L-omp19 não é um agonista capaz de induzir a ativação da via de interferon do tipo I como o DNA purificado de *B. abortus*. Barbalat e colaboradores (2009) apresentaram, de maneira inesperada, que TLR2 é capaz de induzir interferon do tipo I somente em resposta a ligantes virais, enquanto a indução de TNF- α ocorre em resposta tanto aos estímulos derivados de vírus quanto de bactérias. Este trabalho se apresenta de acordo com os dados obtidos nesta tese, aonde um estímulo proveniente de *B. abortus*, a proteína L-omp19, reconhecidamente relacionada

à ativação de uma resposta imune dependente de TLR2, não é agonista para a ativação do sistema de interferon do tipo I.

Estes resultados juntos sugerem que TLR2 ou TLR4 não são receptores candidatos para a ativação do sistema de interferon do tipo I, assim como os seus agonistas, L-omp19 e LPS respectivamente, que são capazes de ativar a indução de uma resposta inflamatória característica da brucelose, não são capazes de ativar a transcrição de *IFN-β*. Além do mais, este trabalho apresenta o DNA purificado de *B. abortus* como um novo agonista do sistema de interferon do tipo I de maneira independente dos receptores do tipo Toll mais associados ao desencadeamento de uma resposta imune eficiente contra Gram-negativas como os TLR2, TLR4 e TLR9.

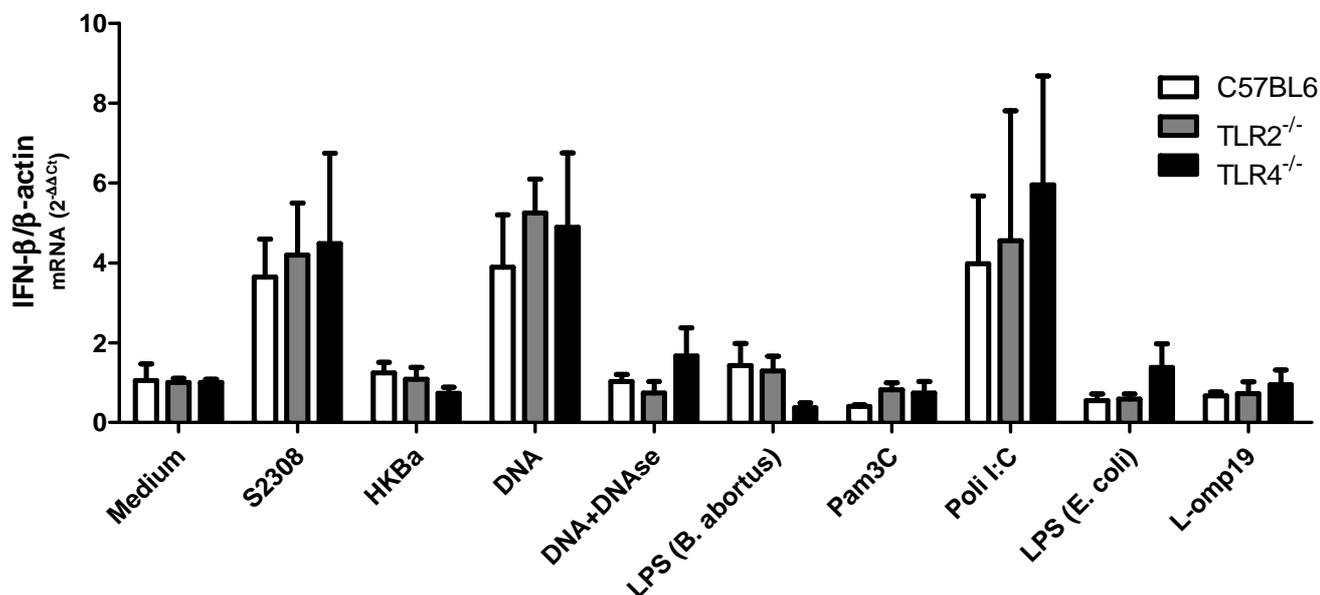


Figura 18. A indução de *IFN-β* pelo DNA purificado de *B. abortus* é independente de TLR2 ou TLR4. O tratamento de BMMØs com *B. abortus* ou o DNA purificado dessa bactéria induz a expressão transcricional de *IFN-β* independente dos receptores TLR2 ou TLR4 ou dos seus agonistas L-omp19 ou LPS, respectivamente, purificados de *B. abortus*.

5.9. *Brucella abortus* induz a expressão de *IFN-β* independente da molécula adaptadora TRIF, mas dependente de MyD88

Diversos grupos relataram interação da *Brucella abortus* com vários TLRs para uma resposta imune efetiva contra essa bactéria (Giambartolomei *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005). Mais recentemente, a participação da molécula adaptadora MyD88 na resposta *in vivo*, demonstrou a exarcebação da brucelose murina em camundongos deficientes para tal molécula adaptadora (Weiss *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2008). Pouco é conhecido sobre a participação da molécula adaptadora TRIF na resposta a infecção por bactérias. Provavelmente devido a sinalização dessa molécula adaptadora somente estar relacionada à transdução de sinal dependente de TLR3 e TLR4 na ativação de NF-κB tardio e *IRF-3* culminando com a indução de citocinas pró-inflamatórias e *IFN-β*, respectivamente (Yamamoto *et al.*, 2003). Ademais, a ativação de interferon do tipo I não era relacionada a infecção bacteriana e sim numa ativação de um estado celular propício ao controle de infecções virais. Atualmente as diferenças dos efeitos de *IFN* tipo I reportadas na imunidade a bactérias refletindo diferentes mecanismos efetores tem chamado a atenção dos imunologistas (Decker *et al.*, 2005). Sendo assim, para acessar o papel da molécula adaptadora TRIF no controle da brucelose murina, camundongos deficientes para esta molécula (*TRIF*^{-/-}) foram infectados intraperitonealmente com a *B. abortus* S2308 e o número de bactérias viáveis foi monitorado no baço de animais *TRIF*^{-/-} e 129Sv/Ev após 2 semanas de infecção através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Diferentemente da

exarcebação da brucelose murina em camundongos deficientes de MyD88, comparado aos animais do grupo controle determinada por Macedo et al., 2008, os camundongos TRIF deficientes não apresentaram alteração na contagem de bactérias viáveis presente no baço quando comparada à contagem de UFC no baço dos camundongos selvagens 129Sv/Ev (Figura 19). Este resultado evidencia que a molécula adaptadora TRIF não está relacionada ao controle da brucelose murina *in vivo*.

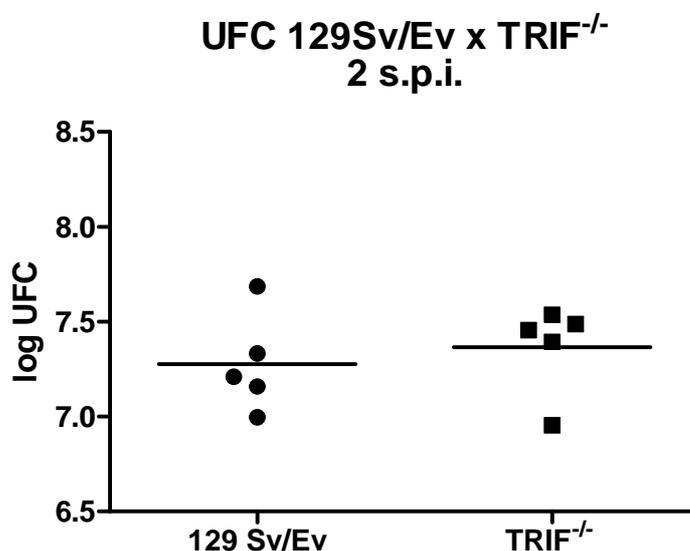


Figura 19. TRIF não está envolvida no controle *in vivo* da brucelose murina. Camundongos TRIF^{-/-} (n=5), e 129Sv/Ev (n=5), foram infectados intraperitonealmente com 10⁶ bactérias e 2 semanas após a infecção o título de *B. abortus* foi analisado no baço desses animais e apresentados em log de CFU. Os dados representam 3 experimentos independentes.

Uma vez que *B. abortus* é capaz de induzir IFN- β *in vitro* e a sinalização dependente de TLRs que culmina na expressão de interferon do tipo I ser dependente de TRIF, foi avaliado em BMM \emptyset s de camundongos TRIF^{-/-} se esta indução é dependente da sinalização através desta molécula adaptadora. Os níveis de transcritos de *IFN- β* de células BMM \emptyset s foram analisados por PCR em tempo real após serem estimuladas com a bactéria viva S2308. Em

concordância com o resultado *in vivo*, os níveis de *IFN-β* obtidos nas células derivadas de camundongos *TRIF^{-/-}* foram semelhantes aos níveis encontrados nas células provenientes dos camundongos controle (129Sv/Ev) sugerindo que a molécula adaptadora TRIF também não está associada à estimulação da expressão de *IFN-β* (Figura 20).

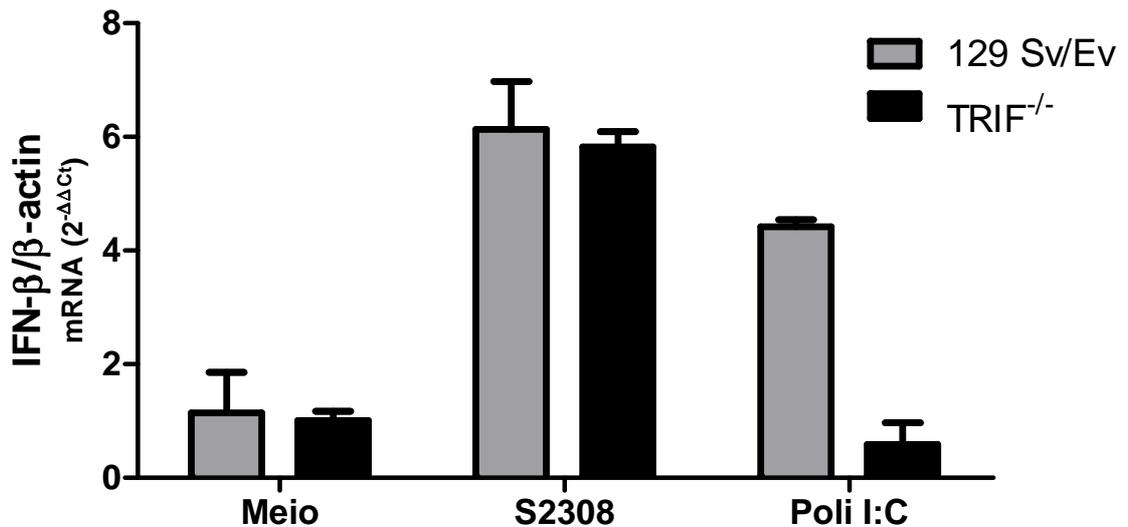


Figura 20. TRIF não está envolvida na indução da expressão de *IFN-β* em BMMØs murinos. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Este resultado sugere que nenhum TLR que utiliza TRIF como molécula adaptadora está envolvido na indução de interferon do tipo I. Os TLRs que poderiam estar envolvidos na sinalização seriam TLR3 ou TLR4 que são capazes de utilizar uma via de sinalização independente do adaptador MyD88 (Yamamoto *et al.*, 2003). Além do mais nenhuma evidência de reconhecimento de *B. abortus* por TLR3 foi reportado. Ao contrário, a função de TLR4 no reconhecimento do LPS de *B. abortus* através da utilização de camundongos C3H/HeJ, mostrando que TLR4 é requerido para o controle do processo infeccioso (Campos *et al.*, 2004). Provavelmente a sinalização mediada por

TLR4 é deslocada no sentido da ativação de citocinas pró-inflamatórias dependente da molécula adaptadora MyD88 (Macedo *et al.*, 2008).

A interação de PAMPs à maioria dos TLRs, desencadeia uma cascata de sinalização que compartilha a proteína adaptadora denominada fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88). Esta molécula recruta proteínas (IRAKs, TRAF-6, TAKs) que formam um complexo capaz de fosforilar proteínas da família de MAPKs (p38, JNK e ERK) e induzir translocação nuclear de NF- κ B (Akira e Takeda, 2004). Essa via de sinalização culmina então na expressiva produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α , e ativação de MAPKs, que possuem diversas funções biológicas.

Apesar dos resultados com camundongos deficientes para TLR9, algumas evidências têm mostrado genes induzidos a jusante da ativação de interferon do tipo I são dependentes da molécula adaptadora MyD88 (Lapaque *et al.*, 2009). Este grupo mostrou que *B. melitensis* quando atinge o seu nicho replicativo intracelular, leva à indução da expressão genes que codificam proteínas de resistência induzidas por interferon (*interferon-inducible resistance proteins* - IRGs, p47 GTPases) de forma dependente de MyD88. Contudo, esta indução não envolve nenhum TLR comumente associado ao reconhecimento de PAMPs de bactérias Gram-negativas como os TLR2, -4, -5 ou -9. Sendo assim, para avaliar a contribuição da molécula adaptadora MyD88 na indução transcrricional de *IFN- β* , BMM \emptyset s de camundongos deficientes para esse adaptador foram estimulados com a bactéria viva ou com o DNA bacteriano purificado e o nível transcrricional de *IFN- β* foi analisado por PCR em tempo real. Surpreendentemente, mesmo de maneira independente de TLR9, BMM \emptyset s provenientes de animais MyD88^{-/-} apresentaram uma grande deficiência na

indução de *IFN-β* quando comparada a indução observado em células provenientes de camundongos C57BL/6. Este resultado evidencia que a indução de *IFN-β* é dependente da molécula adaptadora MyD88 (Figura 21). Tal resultado corrobora os resultados obtidos por Lapaque e colaboradores (2009) aonde é mostrado que a indução de *Irgm3* e *Irga6* não envolve nenhum TLR mas dependem da molécula adaptadora MyD88 quando *Brucella melitensis* atinge seu nicho de replicação intracelular. É importante ressaltar que os macrófagos analisados, provenientes de camundongos selvagens C57BL/6 e *MyD88^{-/-}*, Poli I:C (agonista de TLR3), induzem a expressão de *IFN-β* independente de MyD88. Já é bem descrito que a via de indução de interferon do tipo I por TLR3 não envolve o recrutamento de MyD88, mas sim de TRIF como molécula adaptadora. Concordante com este trabalho é sugerido que *Brucella abortus* é reconhecida por um receptor intracelular ainda desconhecido, diferente daqueles já sugeridos na literatura que reconhecem bactérias Gram-negativas, mas que utiliza como molécula adaptadora MyD88 para a indução de *IFN-β*.

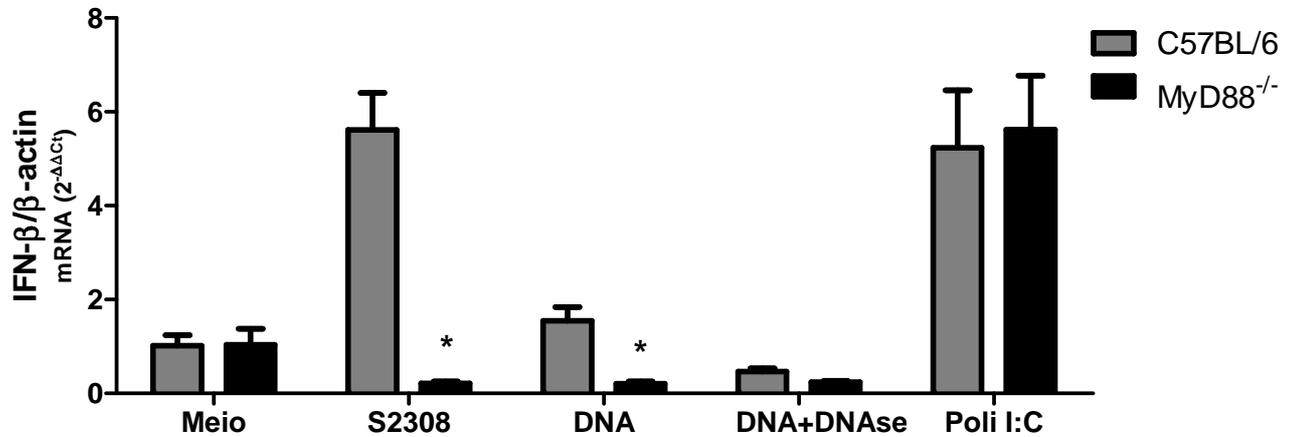


Figura 21. MyD88 é essencial para a indução de *IFN-β*.

O tratamento de BMMØs com *B. abortus* ou o DNA purificado dessa bactéria induz a expressão transcricional de *IFN-β* dependente de MyD88. (*) $p < 0,05$ em relação ao camundongo selvagem C57BL/6.

5.10. O DNA purificado de *B. abortus* induz a sinalização mediada pela fosforilação de STAT1-Tyr701

A via de sinalização dependente da ativação de interferon do tipo I mais bem caracterizada é a transdução mediada por pelos ativadores transcricionais STATs. *IFN-α/β* ao interagir com o receptor de interferon do tipo I desencadeia a ativação de STAT1 e STAT2 através de fosforilações em resíduos específicos na sequência protéica destas moléculas, levando a formação de um complexo protéico heterodimérico STAT1-STAT2 culminando com a indução de genes estimulados por interferon (Platanias, 2005; Gupta *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996). Homodímeros formados por STAT1-STAT1 também

podem ser formados tanto pela estimulação do receptor de interferon do tipo I quanto pelo receptor de IFN- γ (Levy e Darnell Jr., 2002). Para avaliar se a ativação de interferon do tipo I por *B. abortus* ou pelo seu DNA culmina com a ativação da sinalização dependente da fosforilação de STAT1 no resíduo Tyr701, BMMØs de camundongos 129Sv/Ev ou IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} foram estimulados com a bactéria ou com seu DNA purificado e o nível de proteínas p-STAT1-Tyr701 foi avaliado a 6 e a 12 horas após a estimulação. Por análise de *western blotting*, pode-se observar que tanto a bactéria quanto o DNA purificado são capazes de ativar a sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I através da fosforilação de STAT1 no resíduo Tyr-701 em camundongos 129Sv/Ev (Figura 22). Além do mais, pode-se observar que a ativação do sistema está relacionada à presença do receptor de interferon do tipo I já que em BMMØs de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} não foi observado nenhum resíduo de fosforilação de STAT1-Tyr701.

Os resultados indicam que *B. abortus* e o seu DNA são capazes de induzir a produção de IFN- β independente do receptor de interferon do tipo I em BMMØs, e que esta indução é capaz de ativar o sistema mediado pelo receptor via fosforilação de STAT1-Tyr701. Contudo, a ativação de IFN- α está intimamente relacionada à presença do receptor de interferon do tipo I.

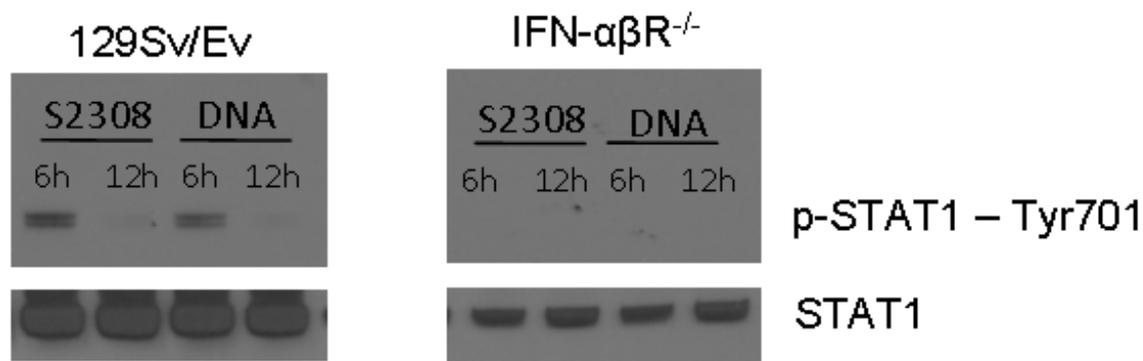


Figura 22. *Brucella abortus* ou seu DNA purificado é capaz de induzir a sinalização dependente de IFN- $\alpha\beta$ R.

A ativação de interferon do tipo I por *B. abortus* ou pelo seu DNA purificado é capaz de induzir a ativação da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I como observado pela fosforilação de STAT1-Tyr701 (*) $p < 0,05$ em relação ao camundongo selvagem 129Sv/Ev.

Miyagi e colaboradores (2007) reportaram que o aumento da ativação de STAT1 durante uma infecção viral pela ativação de receptores de interferon, está associado a uma diminuição da ativação de STAT4, cuja ativação é importante para a indução da produção de IFN- γ em células NK. Como camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} não possuem a sinalização mediada pela fosforilação de STAT1 no resíduo Tyr701, estes animais, provavelmente não possuem um controle de STAT4 mediado por STAT1 em células NK para a produção de IFN- γ . Este menor controle pode estar associado em uma dificuldade de controlar o nível de indução de IFN- γ durante a infecção por *B. abortus*, mas controlando melhor a infecção por não ter o nível desta citocina diminuída durante a infecção.

Vários são os patógenos capazes de induzir a ativação do sistema de interferon do tipo I do hospedeiro durante o processo infeccioso (Decker *et al.*, 2005). Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, alguns modelos de infecção bacteriana relataram que a ativação do sistema de interferon do tipo I resulta no aumento da suscetibilidade do hospedeiro frente a essas infecções. Este trabalho

evidencia mais um modelo de infecção bacteriana no qual *B. abortus* utiliza do sistema imune do hospedeiro e da maquinaria celular para se beneficiar através da indução de interferon do tipo I, mais especificamente de IFN- β . Comparado com os animais 129Sv/Ev, animais deficientes para o IFN $\alpha\beta$ R apresentaram uma maior habilidade em controlar a infecção por *B. abortus*. No caso de infecções por vírus, a ativação do sistema de interferon do tipo I está intimamente relacionada à indução de um estado antiviral das células do hospedeiro. Contudo, a ativação deste sistema em infecções bacterianas ainda é pouco entendida (Stockinger *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi observado que mesmo induzindo altos níveis de IFN- β , camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} não possuem a capacidade de ativar a sinalização dependente deste receptor e desencadear a ativação de genes induzidos por interferon do tipo I, como aqueles considerados como pró-apoptóticos, como o caso de TRAIL. E este fenômeno está de acordo com o fenótipo observado a partir da análise por TUNEL de células esplênicas provenientes de cortes histológicos de baços de animais infectados com a *B. abortus*. Um maior índice de morte celular foi observado em baço de camundongos que possuem a sinalização mediada pelo IFN $\alpha\beta$ R intacto, provavelmente associando um possível mecanismo de maior resistência à *B. abortus* em camundongos que não conseguem sinalizar eficientemente para a ativação de genes pró-apoptóticos. Ademais, análises *in vitro* associam a maior resistência de camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} com uma maior produção de IL-12, IFN- γ e NO no sobrenadante de células, estimuladas com a bactéria, provenientes destes animais quando comparada à produção das mesmas citocinas em sobrenadantes de células provenientes de camundongos selvagens.

Conhecidamente, ácidos nucleicos de patógenos são forte indutores de uma resposta imune inata pelo hospedeiro para a eliminação da infecção (O'Neill, 2009). Neste trabalho evidenciamos que o DNA purificado de *B. abortus* estimula a indução do sistema de interferon do tipo I, uma vez que células estimuladas com este ácido nucleico foram capazes de ativar a transcrição de *IFN-β*.

O receptor da imunidade inata citosólico capaz de reconhecer e sinalizar para a ativação do sistema de interferon do tipo I ainda não é conhecido. Alguns possíveis candidatos são descritos na literatura relacionando modelos bacterianos com os mecanismos pelos quais estes patógenos podem induzir a produção de interferon do tipo I. Utilizando células de camundongos deficientes para os receptores TLR2, -4, -9, NOD2 ou deficientes para os adaptadores MyD88, TRIF, TRAM ou Rip-2, foi observado que a indução de interferon do tipo I em resposta a infecção por *L. monocytogenes* continua a ser ativada (citado por Gold *et al.*, 2004 e Kuchtey *et al.*, 2006). Enquanto a indução de interferon do tipo I ocorre independente destas proteínas, IRF-3 e TBK1 parecem ser essenciais para a ativação deste sistema pela infecção com *L. monocytogenes*. Neste trabalho reportamos que a indução de interferon do tipo I pela infecção por *B. abortus* parece ser dependente da molécula adaptadora MyD88 e de IRF-3, mas independente dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 e da molécula adaptadora TRIF. Tais resultados sugerem que uma via de sinalização independente de TLRs, mas dependente de MyD88 e IRF-3, ativam *IFN-β* após infecção por *B. abortus* ou estimulação com o DNA purificado desta bactéria após o reconhecimento por um receptor citosólico ainda desconhecido.

Os resultados obtidos neste trabalho associados às características já descritas da infecção por *B. abortus* sugerem alguns eventos associados à infecção por esta bactéria com a ativação do sistema de interferon do tipo I.

O modelo de infecção, delineado a partir dos resultados deste trabalho, se inicia com o recrutamento de células do sistema imune inato com a finalidade de fagocitar a bactéria. *B. abortus* é internalizada e atinge o seu nicho replicativo, o “Brucelossomo”. Algumas bactérias são eliminadas nas primeiras 12 horas após a infecção através da associação dos endossomos contendo a bactéria com vesículas endossomais tardias ou com lisossomos (Starr *et al.*, 2008). Os endossomos contendo as bactérias que não foram eliminadas estabelecem um nicho replicativo após interagir com a membrana de retículo endoplasmático da célula hospedeira obtendo marcadores celulares importantes para evadir da via endocítica (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998).

Este nicho replicativo é o local ideal para sobrevivência e replicação da *Brucella*. Contudo, quando a célula hospedeira se encontra com muitos “Brucelossomos” e os nutrientes não são mais capazes de sustentar o processo replicativo bacteriano, algumas bactérias ou morrem ou utilizam o sistema de secreção do tipo IV para externalizar componentes bacterianos para o citoplasma do hospedeiro. Estes padrões moleculares associados à *B. abortus* disponíveis no citoplasma da célula hospedeira ficam passíveis de serem reconhecidos pelos componentes do sistema imune inato do hospedeiro e induzir rapidamente uma resposta contra a infecção.

Até o momento, pouco é relatado sobre receptores intracelulares associados ao reconhecimento e ao controle de *B. abortus*. Apesar de TLR9 ter sido relatado como receptor importante no controle desta infecção, este

receptor endossomal não está relacionado ao reconhecimento do DNA purificado de *B. abortus* e ativação da sinalização que culmina com a ativação de *IFN-β*.

Uma vez disponível no citoplasma da célula hospedeira, o DNA é reconhecido por um receptor capaz de utilizar a molécula adaptadora MyD88, mas não TRIF, e sinalizar de maneira dependente de IRF-3 para ativação de *IFN-β*. De maneira parácrina ou autócrina, *IFN-β* interage com o receptor de interferon do tipo I ativando a via clássica Jak-STAT culminando com a ativação de genes induzidos por interferon do tipo I. Entre estes genes, ativadores transcricionais como IRF7 podem ser induzidos e atuar como ativador de genes *IFN-α* retroalimentando o sistema pela interação das citocinas codificadas por esses genes ao receptor de interferon do tipo I. Além de levar à indução de ativadores transcricionais, a sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I pode induzir a expressão de genes pró-apoptóticos. Assim como o DNA da *B. abortus* foi capaz de ativar o sistema de interferon do tipo I, foi observado também que o sistema foi capaz de ativar transcricionalmente *TRAIL* de forma dependente da sinalização mediada pelo receptor de interferon do tipo I.

TRAIL, uma vez induzido, deve ligar-se ao receptor presente na superfície celular como Fas/CD95 ou *TRAIL/Apo2L*, membros da família de receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR), culminando no recrutamento e ativação de proteínas efetoras que sinalizam para um processo de morte celular programada. Uma das principais proteínas efetoras que são ativadas pela sinalização dependente do receptor de *TRAIL* são as caspases (Duprez *et al.*, 2009). A morte celular programada é um mecanismo ancestral chave nos

organismos multicelulares para a manutenção da homeostase tanto em nível celular quanto em nível tecidual. Dentre os eventos capazes de induzir a morte celular programada podem-se destacar aqueles relacionados à morfogênese e homeostase tecidual, renovação de células lábeis e a resposta imunológica do organismo frente à infecção por um agente patogênico. A eliminação de células infectadas por um processo de morte celular programada tem papel fundamental na defesa do organismo contra a infecção por bactérias, vírus e parasitas (Böhme e Rudel, 2009). Contudo, vários patógenos possuem estratégias sofisticadas para subverter o sistema imune do hospedeiro através da modulação do processo de morte celular programada. Alguns patógenos conseguem modular o processo de morte celular evitando ou induzindo tal processo. Apesar da morte celular promovida pelo sistema imune do hospedeiro levar à morte de bactérias intracelulares, algumas podem se manter viáveis dentro dos corpos apoptóticos ou escapar devido a fragmentação das membranas celulares. Duas hipóteses de como subverter o sistema de eliminação do patógeno podem ser sugeridas através deste processo. Primeiramente, como os corpos apoptóticos são fagocitados por células fagocitárias profissionais que são recrutadas em locais aonde o processo de morte celular programada está ocorrendo, *Brucella spp.* viáveis presente nestes corpos apoptóticos são rapidamente capazes de infectar novas células restabelecendo o processo infeccioso em uma nova célula. Outra maneira da bactéria ser capaz de continuar seu processo infeccioso no hospedeiro é escapando dos corpos apoptóticos através da fragmentação das membranas celulares e conseguindo infectar novas células, restabelecendo o seu ciclo de infecção (Figura 23).

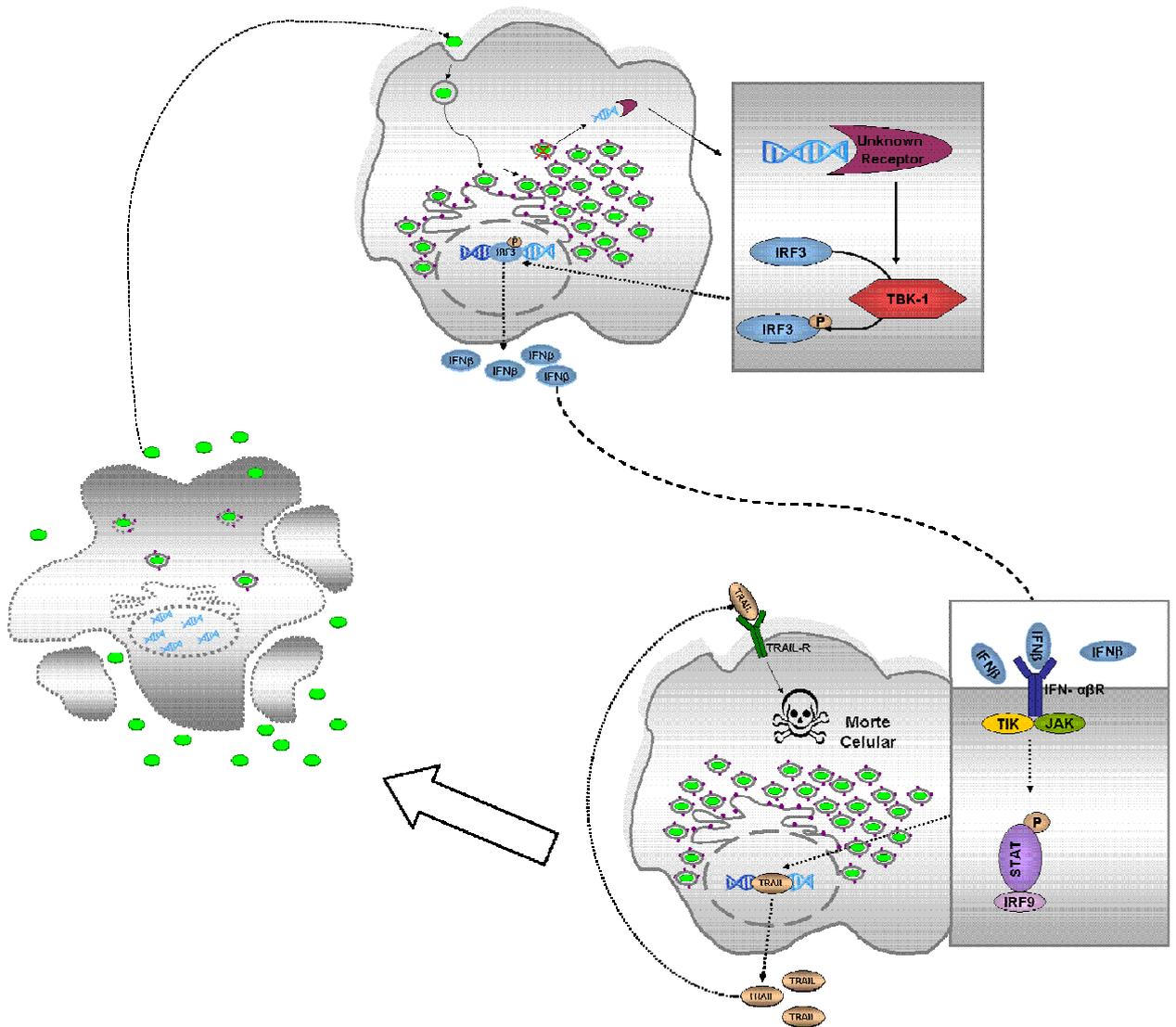


Figura 23. Modelo de subversão do sistema imune por *B. abortus*.

Quando a célula hospedeira se encontra com muitos brucelossomos e os nutrientes não são mais capazes de sustentar o processo replicativo bacteriano algumas bactérias ou morrem ou utilizam o sistema de secreção do tipo IV para externalizar componentes bacterianos para o citoplasma do hospedeiro. O DNA de *B. abortus* quando presente no citoplasma da célula hospedeira é reconhecido por um receptor ainda desconhecido capaz de sinalizar utilizando a molécula adaptadora MyD88 ativando IRF-3 que atua como ativador transcricional de *IFN-β*. De maneira autócrina ou parácrina, *IFN-β* interage com receptor de interferon do tipo I que medeia a sinalização via Jak-STAT ativando genes pró-apoptóticos como TRAIL. TRAIL interage com seu receptor cognato que sinaliza para a ativação de uma morte celular programada, culminando com a exposição de *Brucellas* que conseguem restabelecer o processo infeccioso nas células presentes ao redor do corpo apoptótico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta tese nos permite concluir que a *B. abortus* é capaz de induzir *IFN-β* mediado por MyD88 e IRF-3, mas independente de TLR2, TLR4 ou TLR9 e da molécula adaptadora TRIF. Esta produção de *IFN-β* e posterior sinalização pelo seu receptor estão relacionadas ao fenótipo de menor suscetibilidade à infecção, devido, provavelmente, à indução de apoptose celular levando à uma multiplicação da infecção em células hospedeiras adjacentes. Este trabalho levanta mais uma questão relevante a ser respondida que refere-se ao tipo de receptor capaz de reconhecer o DNA da *B. abortus* e desencadear a ativação de interferon do tipo I. A possibilidade de que *B. abortus* tenha adquirido durante o processo evolutivo a habilidade de ativar o sistema de interferon do tipo I com o exclusivo propósito de continuar o seu processo biológico de infecção e replicação no hospedeiro também são questões que este trabalho propõe para serem respondidas no futuro próximo. Ademais, este trabalho apresenta o DNA de *B. abortus* como uma molécula capaz de induzir interferon do tipo I e associa esta molécula como importante fator de virulência por induzir à morte programada às células hospedeiras infectadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. **Imunologia Celular e Molecular.**

6. ed. USA: Saunders, 2008. 564p.

AKIRA, S. e TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nat. Rev. Immunol.** 4:

499-511, 2004.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate

immunity. **Cell** 124: 783-801, 2006.

ALBIGER, B.; DAHLBERG, S.; HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S.

Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J. Intern. Med.**, 261: 511-528, 2007.

ARAYA, L. M.; ELZER, P. H.; ROWE, G. R.; ENRIGHT, R. M.; WINTER, A. J.

Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. **J. Immunol.**, 143: 3330-3337, 1989.

AUERBACH, V.; BROCKSTEDT, D. G.; MEYER-MORSE, N.; O'RIORDAN, M.;

PORTNOY, D. A. Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. **J. Exp. Med.**, 200: 527-533, 2004.

- BALLAS, Z. K.; RASMUSSEN, W. L.; KRIEG, A. M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. **J. Immunol.**, 157: 1840-1845,1996.
- BANGA, S.; GAO, P.; SHEN, X.; FISCUS, V.; ZONG, W. Z.; CHEN, L.; LUO, Z. Q. *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, 104: 5121-5126, 2007.
- BARBALAT, R.; LAU, L.; LOCKSLEY, R. M.; BARTON, G. M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. **Nature Immunology**, 10: 1200-1207, 2009.
- BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, 7: 99-109, 2009.
- BOGDAN, C.; MATTNER, J.; SCHLEICHER, U. The role of type I interferons in non-viral infections. **Immunological Reviews**, 202: 33-48, 2004.
- BERGUER, P. M.; MUNDINANO, J.; PIAZZON, I.; GOLDBAUM, F. A. A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. **J. Immunol.**,176: 2366–72, 2006.

BÖHME, L.; RUDEL, T. Host cell death machinery as a target for bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, 11: 1063-1070, 2009.

BOUCHONNET, F.; BOECHAT, N.; BONAY, M.; HANCE, A. J. Alpha/beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth *Mycobacterium bovis* BCG. **Infect. Immun.**, 70: 3020-3025, 2002.

BRIERLEY, M. M.; FISH, E. N. IFN- α/β receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, 22: 835-845, 2002.

CAMPOS, M. A., G. M. ROSINHA, I. C. ALMEIDA, X. S. SALGUEIRO, B. W. JARVIS, G. A. SPLITTER, N. QURESHI, O. BRUNA-ROMERO, R. T. GAZZINELLI E S. C. OLIVEIRA Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. **Infect Immun.**, 72: 176-186, 2004.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in roman populations. **Journal of Infection**, 45: 122-127, 2002.

CARRERO, J. A., CALDERON, B.; UNANUE, E. R. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. **J. Exp. Med.**, 200: 535-540, 2004.

CHEERS, C.; HO, M. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, 34: 299-309, 1983.

CIRL, C.; WIESER, A.; YADAV, M.; DUERR, S.; SCHUBERT, S.; FISCHER, H.; STAPPERT, D.; WANTIA, N.; RODRIGUEZ, N.; WAGNER, H.; SVANBORG, C.; MIETHKE, T. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. **Nat Med.**, 14: 399-406, 2008.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J-M.; GRAYON, M.; PAQUET, J-Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. **Microbes and Infection**, 3: 729-738, 2001.

COOPER, A. M.; PEARL, J. E.; BROOKS, J. V.; EHLERS, S.; ORME, I. M. Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of *Mycobacterium tuberculosis* in the murine lung. **Infect. Immun.**, 68: 6879–6882, 2000.

COPIN, R.; DE BAETSELIER, P.; CARLIER, Y.; LETESSON, J. J.; MURAILLE, E. MyD88 dependent activation of B220⁻CD11⁺LY6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. **J. Immunol.**, 178: 5182-5191, 2007.

CORBEL, M. J.; Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, n.3, v.2, p.213-221, 1997.

CORBEL, M. J.; MORGAN, W. J. B. Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173AL. In: Holt, J. G., editor. *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, p.377-388, 1984.

CUTLER, S. J.; WHATMORE, A. M.; COMMANDER, E. N. J. Brucellosis--new aspects of an old disease. **J. Appl. Microbiol.**, 98: 1270-81, 2005.

DECKER, T.; MÜLLER, M.; STOCKINGER, S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. **Nature Reviews Immunology**, 1-13, 2005.

DENIS, M. Recombinant murine beta interferon enhances resistance of mice to systemic *Mycobacterium avium* infection. **Infect. Immun.**, 59: 1857-1859, 1991.

DETILLEUX, P. G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. **Infect. Immun.**, 58: 2320-2328, 1990.

DIACOVICH, L.; GORVEL, J. P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature Reviews Microbiology**, 8: 117-128, 2010.

DUPREZ, L.; WIRAWAN, E.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, 11: 1050-1062, 2009.

FEHR, T.; SCHOEDON, G.; ODERMATT, B.; HOLTSCHEKE, T.; SCHNEEMANN, M.; BACHMANN, M. F.; MAK, T. W.; HORAK, I.; ZINKERNAGEL, R. M. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. **J. Exp. Med.**, 185: 921–931, 1997.

FITZGERALD, K. A., D. C. ROWE, B. J. BARNES, D. R. CAFFREY, A. VISINTIN, E. LATZ, B. MONKS, P. M. PITHA E D. T. GOLENBOCK. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. **J. Exp. Med.**, 198: 1043-55, 2003.

FRITZ, J. H.; FERRERO, R. L.; PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nature Immunology**, 7: 1250-1257, 2006

GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, 14: 1237–1243, 2007.

GE, Y.; RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways. **Cellular Microbiology**, 8: 1406-1416, 2006.

GIAMBARTOLOMEI, G. H.; ZWERDLING, A.; CASSATARO, J.; BRUNO, L.; FOSSATI, C. A.; PHILIPP, E M. T. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. **J. Immunol.**, 173: 4635-42, 2004.

GOLD, J. A.; HOSHINO, Y.; HOSHINO, S.; JONES, M. B.; NOLAN, A.; WEIDEN, M. D. Exogenous gamma and alpha/beta interferon rescues human macrophages from cell death induced by *Bacillus anthracis*. **Infect. Immun.**, 72: 1291-1297, 2004.

GOLDING, B., SCOTT, D. E.; SCHARF, O.; HUANG, L. Y., ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, E H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection** 3: 43-8, 2001.

GOMES, M. S.; APPELBERG, R. NRAMP1- or cytokine-induced bacteriostasis of *Mycobacterium avium* by mouse macrophages is independent of the respiratory burst. **Microbiology**, 148: 3155-3160, 2002.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet. Microbiol.**, 90: 281-97, 2002.

GUPTA, S.; YAN, H.; WONG, L. H.; RALPH, S.; KROLEWSKI, J.; SCHINDLER, C. The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals. **EMBO J.**, 15: 1075-1084, 1996.

HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; ZUERNER, R. L.; QING, Z.; LI, L-L.; KAPUR, V.; ALT, D. P.; OLSEN, S. C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **J. Bacteriol.**, 187: 2715-2726, 2005.

HALPERN, M. D.; KURLANDER, R. J.; PISETSKY, D. S. Bacterial DNA induces murine interferon- γ production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α . **Cellular Immunology**, 167: 72-78, 1996.

HO, M.; ARMSTRONG, J.A. Interferon. **Am. Rev. Microbiol.**, 29: 131, 1975.

HORNUNG, V.; BAUERNFEIND, F.; HALLE, A.; SAMSTAD, E. O.; KONO, H.; ROCK, K. L.; FITZGERALD, K. A.; LATZ, E. Silica crystals and aluminum

salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, 9: 847-856, 2008.

HUANG, L. Y.; ALIBERTI, J.; LEIFER, C. A.; SEGAL, D. M.; SHER, A.; GOLENBOCK, D. T.; GOLDING, E. B. Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. **J. Immunol.**, 171: 1441-6, 2003.

HUANG, L. Y., ISHII, K. J.; AKIRA, S.; ALIBERTI, J.; GOLDING, E. B. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. **J. Immunol.**, 175: 3964-70, 2005.

ISAACS, A.; LINDERMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 147: 258-267, 1957.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, 20: 197-216.

JONES, S. M.; WINTER, A. J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. **Infect. Immun.**, 60: 3011-3014, 1992.

JOSHI, S. G.; FRANCIS, C. W.; SILVERMAN, D. J.; SAHNI, S. K. NF- κ B activation suppresses host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection via regulatory effects on intracellular localization or levels of apoptogenic and anti-apoptotic proteins. **FEMS Microbiology Letters**, 234: 333-341, 2004.

KIM, S.; WATARAI, M.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. **Microb. Pathog.**, 33: 225-37, 2002.

KLINMAN, D. M.; YI, A. K.; BEAUCAGE, S. L.; CONOVER, J.; KRIEG, A. M. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 93: 2879-2883, 1996.

KUCHTEY, J.; FULTON, S. A.; REBA, S. M.; HARDING, C. V.; BOOM, H. Interferon- $\alpha\beta$ mediates partial control of early pulmonary *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin infection. **Immunology**, 118: 39-49, 2006.

LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Curr. Opin. Microbiol.**, 8: 60-6, 2005.

LAPAQUE, N.; MULLER, A.; ALEXOPOULOU, L.; HOWARD, J. C.; GORVEL, J. P. *Brucella abortus* induces Irgm3 and Irga6 expression via type-I IFN by a MyD88-dependent pathway, without the requirement of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9. **Microb Pathog.**, 47: 299-304, 2009.

LEVY, D. E.; DARNELL Jr., J. E. STATS: Transcriptional control and biological impact. **Nature Reviews**, 3: 651-662, 2002.

MACEDO, G. C.; MAGNANI, D. M.; CARVALHO, N. B.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **J. Immunol.**, 180: 1080-1087, 2008.

MANCA, C.; TSENOVA, L.; BERGTOLD, A.; FREEMAN, S.; TOVEY, M.; MUSER, J. M.; BARRY III, C. E.; FREEDMAN, V. H.; KAPLAN, G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\alpha\beta$. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98: 5752-5757, 2001.

MEYER, M. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. In: Animal Brucellosis. K. Nielsen and J.R. Duncan, eds. CRC Press, Inc., p.1-17, 1990.

MIYAGI, T.; GIL, M. P.; WANG, X.; LOUTEN, J.; CHU, W-M.; BIRON, C. A. High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1

interferon effects in natural killer cells. **J. Exp. Med.**, 204: 2383-2396, 2007.

MORENO, E.; STACKEBRANDT, E.; DORSCH, M.; WOLTERS, J.; BUSCH, M.; MAYER, E. H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. **J. Bacteriol.**, 172: 3569-76, 1990.

MURUVE, D. A.; PÉTRILLI, V.; WHITE, L. R.; CLARK, S. A.; ROSS, P. J.; PARKIS, R. J.; TSCHOPP, J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. **Nature**, 452: 103-107, 2008.

NICOLETTI, P. L. A short history of brucellosis. **Vet. Microbiol.**, 90: 5-9, 2002.

NICOLETTI, P. L. Relationship between animal and human disease. **In:** Brucellosis: clinical and laboratory aspects. Young, E.J. and Corbel, M.J. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p.41-51, 1989.

O'CONNELL, R. M.; SAHA, S. K.; VAIDYA, S. A.; BRUHN, K. W.; MIRANDA, G. A.; ZARNEGAR, B.; PERRY, A. K.; NGUYEN, B. O.; LANE, T. F.; TANIGUCHI, T.; MILLER, J. F.; CHENG, G. Type I interferon production

enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. **J. Exp. Med.**, 200: 437-445, 2004.

O'NEILL, L. A. J. DNA makes RNA makes innate immunity. **Cell**, 138: 428-430, 2009.

O'RIORDAN, M.; YI, C. H.; GONZALES, R.; LEE, K-D. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99: 13861-13866, 2004.

OLIVEIRA, S. C.; OLIVEIRA, F. S.; MACEDO, G. C.; ALMEIDA, L. A.; CARVALHO, N. B. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. **Microbes and Infection**, 10: 1005-1009, 2008.

OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G. A. CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45^{RBlo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. **Eur. J. Immunol.**, 25: 2551-7, 1995.

PALAND, N.; RAJALINGAM, K.; MACHUY, N.; SZCZEPEK, A.; WEHRL, W.; RUDEL, T. NF- κ B and inhibitor of apoptosis proteins are required for apoptosis resistance of epithelial cells persistently infected with

- Chlamydophila pneumoniae*. **Cellular Microbiology**, 8: 1643-1655, 2006.
- PAPPAS, D. G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRIDITIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Disease**, 6: 91-99, 2006.
- PARK, J. H.; KIM, Y. G.; MCDONALD, C.; KANNEGANTI, T. D.; HASEGAWA, M.; BODY-MALAPEL, M.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. **J. Immunol.**, 178: 2380–2386, 2007.
- PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, 202: 8-32, 2004.
- PHILPOTT, D. J.; YAMAOKA, S.; ISRAEL, A.; SANSONETTI, P. J. Invasive *Shigella flexneri* activates NF- κ B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. **J. Immunol.**, 165: 903–914, 2000.
- PIZARRO-CERDA, J.; MERESSE, S.; PARTON, R. G., VAN DER GOOT, G., SOLA-LANDA, A., LOPEZ-GONI, I.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates

in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. **Infect. Immun.**, 66: 5711–5724, 1998.

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I-and-type-II-interferon mediated signaling. **Nature Reviews**, 5: 375-386, 2005.

POESTER, P. F.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, 90: 55-92, 2002.

QIU, H.; FAN, Y.; JOYEE, A. G.; WANG, S.; HAN, X.; BAI, H.; JIAO, L.; ROOIJEN, N. V.; YANG, X. Type I IFNs enhance susceptibility to *Chlamydia muridarum* lung infection by enhancing apoptosis of local macrophages. **J. Immunol.**, 181: 2092-2102, 2008.

RADHAKRISHNAN, G. K.; YU, Q.; HARMS, J. S.; SPLITTER, G. A. *Brucella* TIR domain-containing protein mimics properties of the Toll-like receptor adaptor protein TIRAP. **J. Biol. Chem.**, 284: 9892-9898, 2009.

RE, F.; STROMINGER, J. L. Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. **Immunobiology**, 209: 191-8, 2004.

REHWINKEL, J.; TAN, C. P.; GOUBAU, D.; SCHULZ, O.; PICHLMAIR, A.; BIER, K.; ROBB, N.; VREEDE, F.; BARCLAY, W.; FODOR, E.; REIS E SOUSA, C. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. **Cell**, 140: 397-408, 2010

ROTHFUCHS, A. G.; TRUMSTEDT, C.; WIGZELL, H. ROTTENBERG, M. E. Intracellular bacterial infection-induced IFN- γ is critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN α/β -STAT1 signaling. **J. Immunol.**,172: 6345-6353, 2004.

SALCEDO, S. P.; MARCHESINI, M. I.; LELOUARD, H.; FUGIER, E.; JOLLY, G.; BALOR, S. MULLER, A.; LAPAQUE, N.; DEMARIA, O.; ALEXOPOULOU, L.; COMERCI, D. J.; UGALDE, R. A.; PIERRE, P.; GORVEL, J. P. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. **PLoS Pathog.**, 4(2), e21, 2008.

SANGARI, F. J.; AGUERO, J. Molecular basis of *Brucella* patogenicity: An update. **Microbiología SEM**, 12: 207-218, 1996.

SCHIAVONI, G.; MAURI, C.; CALEI, D.; BELARDELLI, F.; PASTORIS, M. C.; PROIETTI, E. Type I IFN protects permissive macrophages from *Legionella pneumophila* infection through an IFN- γ -Independent pathway. **J. Immunol.**,173: 1266-1275, 2004.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol.**, 75: 163-189, 2004.

STARR, T.; NG, T. W.; WEHRLY, T. D.; KNODLER, L. A.; CELLI, J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. **Traffic**, 9: 678-694, 2008.

STOCKINGER, S.; REUTTERER, B.; SCHALJO, B.; SCHELLACK, C.; BRUNNER, S.; MATERNA, T.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; TANIGUCHI, T.; MURRAY, P. J.; MÜLLER, M.; DECKER, T. IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. **J. Immunol.**, 173: 7416-7425, 2004.

SUELTFUSS, E. A.; POLLARD, M. Cytochemical assay of interferon produced by duck hepatitis virus. **Science**, 139: 595-596, 1963.

TAKAOKA, A.; WANG, Z. C.; CHOI, M. K.; YANAI, H.; NEGISHI, H.; BAN, T.; LU, Y.; MIYAGISHI, M.; KODAMA, T.; HONDA, K.; OHBA, Y.; TANIGUCHI, T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. **Nature**, 448: 501-505, 2007.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, 21: 335–376, 2003.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Type I Interferons. **J. Biol. Chem.**, 282: 15319- 15323, 2007

UGALDE, R. A. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. **Microbes and Infection**, 1: 1211-9, 1999.

VAN PESCH, V.; LANAYA, H.; RENAULD, J.C, MICHIELS, T. Characterization of the murine alpha interferon gene family. **J Virol.**, 78: 8219-8228, 2004.

VASSALO, D. J. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. **Journal of the Royal Naval Medical Corps**, 138: 140-150, 1992.

VEMULAPALLI, R.; DUNCAN, A. J.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N.; TOTH, T. E.; SCHURIG, G. G. Cloning and sequencing of *yajC* and *secD* homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to YajC in mice vaccinated with *B. abortus* RB51. **Infect Immun.**, 66: 5684–5691, 1998.

VOTH, D. E.; HEINZEN, R. A. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. **Cellular Microbiology**, 9: 829-840, 2007.

WATARAI, M.; MAKINO, S.; FUJII, Y.; OKAMOTO, K.; SHIRAHATA, T.
Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. **Cell Microbiol.**, 4: 341-55, 2002.

WEISS, D. S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A.; MORENO, E.
MyD88, but not Toll-Like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. **Infect Immun.**, 73: 5137-5143, 2005.

WINTER, A. J.; DUNCAN, J. R.; SANTISTEBAN, C. G.; DOUGLAS, J. T.,
ADAMS, L. G. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *B. abortus* infection in mice. **Infection and Immunity**, 57: 3438-3444, 1989.

WYATT, H. V. Royal Navy Surgeons and the transmission of brucellosis by goat's milk. **Journal of the Royal Naval Medical Service**, 85: 112-117, 1999.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science** 301: 640-3, 2003.

YAN, H.; KRISHNAN, K.; GREENLUND, A. C.; GUPTA, S.; LIM, J. T. E.; SCHREIBER, R. D.; SCHINDLER, C. W.; KROLEWSKI, J. J. Phosphorylated interferon- α receptor 1 subunit (IFN α R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. **EMBO**, 15: 1064-1074, 1996.

YONEYAMA, M.; FUJITA, T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. **Immunol. Rev.**, 227: 54-65, 2009.

YOUNG, E. J. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica (APMIS.) Supplementum**, 3, p.17-20, 1988.

ZHAN, Y.; LIU, Z.; CHEERS, C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. **Infect. Immun.**, 64: 2782-6, 1996.

Artigos

Oliveira SC, de Oliveira FS, Macedo GC, **de Almeida LA**, Carvalho NB. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect.* 2008 Jul;10(9):1005-9. Epub 2008 Jul 10.

Oliveira SC, Macedo GC, **de Almeida LA**, de Oliveira FS, Oñate, A, Cassataro, J, Giambartolomei, GH. Recent advances in understanding immunity against brucellosis: application for vaccine development. *The Open Veterinary Science Journal.* 2010. (Artigo aceito para publicação).

Lacerda, TLS, Cardoso, PG, **de Almeida, LA**, Camargo, ILBC, Afonso, DAF, Trant, CC, Macedo GC, Campos, E, Cravero, SL, Salcedo, SP, Gorvel, J-P, Oliveira, SC. Inactivation of formyltransferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine.* 2010 (Artigo submetido).

De Almeida LA, Carvalho NB, de Oliveira FS, Macedo GC, Lacerda, TLS, Nogueira, L, Bafica, A., Vaconcelos, AC, Silva, AM, Oliveira, SC. MyD88 and STING Signaling Pathways Are Required for IRF3-Mediated IFN- β Induction in Response to *Brucella abortus* Infection. (Artigo submetido)