



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Fernanda Souza de Oliveira

***Avaliação do papel da proteína Cinase Associada ao
Receptor de Interleucina-1 4 (IRAK-4) na resposta imune
inata durante a infecção causada pela bactéria
intracelular *Brucella abortus****

Sérgio Costa Oliveira

Orientador

Belo Horizonte

Abril, 2011

Fernanda Souza de Oliveira

***Avaliação do papel da proteína Cinase Associada ao
Receptor de Interleucina-1 4 (IRAK-4) na resposta
imune inata durante a infecção causada pela
bactéria intracelular 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: Dr. Sérgio Costa Oliveira

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte

Abril, 2011

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento
envolvido. Não na vitória propriamente dita.”*

Mahatma Gandhi

*Dedico aos meus pais Mário e Maria, exemplos de
amor incondicional e perseverança.*

Agradecimentos

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela infra-estrutura e pela acolhida.

Ao CNPq, a CAPES e a FAPEMIG pelo financiamento do projeto e pela bolsa concedida.

Ao Professor Sérgio Costa pela generosidade em me receber em seu laboratório, pela presença constante e orientação, pela confiança e amizade durante todo o tempo de convivência.

Ao Dr. André Báfica pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À grande amiga Sandra, por fazer com que o trabalho no LIDI funcione da melhor maneira possível e principalmente pelo carinho, amizade e bons conselhos durante toda esta minha caminhada.

À Nat por pacientemente ter me ensinado, ajudado e pelo companheirismo durante esse tempo de trabalho no laboratório, sendo fundamental desde quando cheguei a BH. À Ana Macedo por ter me ajudado em muitos momentos de aperto e por ter sido sempre presente durante o desenvolvimento desse projeto.

Ao Marco Túlio pela grande ajuda nos experimentos de sinalização celular e ao Léo pela colaboração neste trabalho.

Ao meu grande amigo Gilson, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos, principalmente agora na reta final. Às ex-lidianas Cyntia e Fernandinha pela amizade e ajuda durante o período de convivência no LIDI.

Aos amigos do LIDI, todos sem exceção, colaboraram para realização deste trabalho. Agradeço ainda pela boa convivência e amizade.

À Professora Ana Lúcia pelo carinho com que me recebeu em seu laboratório e pela ajuda na determinação do *background* genético dos animais utilizados neste estudo. À Isabel por também me ajudar nesse estudo e nas tipagens dos camundongos.

Aos ex-lidianos, que me receberam tão bem e me ajudaram na difícil etapa de ambientação ao novo.

Aos amigos do ICB, principalmente aos amigos adquiridos no curso de bases!

Aos meus pais Mário e Maria, sem eles nada disso seria possível. Agradeço todo o amor gratuito, pelo apoio em todos os momentos bons e ruins. Ao meu irmão Paulo pelas constantes orações, pela amizade e carinho.

À minha irmã Luciana, pela paciência e por sempre ter disposição para me escutar. Pela presença constante em todos os momentos da minha vida. Agradeço pela amizade e amor.

Aos meus novos irmãos, Kaabah e Gal. Ao Kaabah pela amizade e companheirismo e à Gal pela amizade e pelo carinho.

A toda a minha família, tias, tios e primos pelo carinho e por se orgulharem de mim.

A todas as minhas amigas, principalmente a Tatá, a Dani e a Béia, por toda a amizade e presença constante e por fazerem tudo ficar mais fácil alegrando a minha vida.

À Ju, amiga e companheira de república. Agradeço pela amizade e valiosa companhia.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram, tornando possível a realização desse sonho: Muito Obrigada!!!!

Agradeço a Deus por me possibilitar ter muito mais do que desejei e por ter colocado em minha vida pessoas tão importantes para a realização deste sonho.

Fernanda S. Oliveira

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bactérias do gênero *Brucella*.

Figura 2: Tráfego intracelular da *Brucella*.

Figura 3: Sinalização via os receptores do tipo Toll (TLR).

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

Figura 5: Evasão da resposta imune inata pela *Brucella* por meio da regulação das vias de ativação dos receptores TLRs.

Figura 6: Participação das IRAKs na ativação de NF- κ B e MAP cinases induzida pela via dos TLRs dependente de MyD88.

Figura 7: Regiões de anelamento dos iniciadores utilizados para genotipagem dos animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}.

Figura 8: Tipagem dos animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}.

Figura 9: Cinética de infecção em camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}.

Figura 10: Cinética de produção de IL-12p40 no de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} infectados com *B. abortus*.

Figura 11: Produção de IFN- γ pelas células do baço de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} infectados com *B. abortus*.

Figura 12: Produção de TNF- α pelas células do baço de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} infectados com *B. abortus*.

Figura 13: Produção de óxido nítrico pelas células do baço de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} infectados com *B. abortus*.

Figura 14: Dotplot demonstrando a seleção das células analisadas de acordo com o tamanho e a granulosidade.

Figura 15: Avaliação dos tipos celulares produtores de IFN- γ no baço de animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} infectados com *B. abortus*.

Figura 16: Produção de IL-12p40 (A) e TNF- α (B) pelas células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}.

Figura 17: Produção de IL-12p40 (A) e TNF- α (B) pelos macrófagos inflamatórios de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}.

Figura 18: Produção de IL-12p40 (A) e TNF- α (B) pelos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}.

Figura 19: Avaliação da sinalização celular em BMM ϕ .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem das células produtores de IFN- γ dentro da população total de cada tipo celular avaliado.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Micrograma

µL: Microlitro

APC: Célula Apresentadora de Antígeno

BB: Brucella broth

BMDC: Célula dendrítica derivada da medula óssea

BMMØ : Macrófago derivado de medula óssea

Btp1: do inglês *Brucella* TIR protein 1

CD: do inglês *Cluster of Differentiation*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: ácido desoxirribonucléico

ELISA: Ensaio de absorção imunoenzimático

M-CSF (LCCM): fator estimulador de colônias de monócitos

GM-CSF: fator estimulante de macrófago e granulócitos

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HKBa: *Brucella abortus* inativada pelo calor

IFN: Interferon

IFN-γ: Interferon gama

IFN-β: Interferon beta

IL: Interleucina

IL-12: Interleucina 12

IgG: Imunoglobulina G

IRAK: Cinase associada a receptor IL-1

IRAK-4^{+/-}: Heterozigoto para a molécula IRAK-4

IRAK-4^{-/-}: Deficiência para a molécula IRAK-4

IRF: Fator regulatório de interferon

Log: Logaritmo

LPS: Lipopolissacarídeo

MAP cinase : 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 kappa B

NOD: do inglês *Nucleotide Oligomerization Domain*

NO: Óxido Nítrico

NK: *natural killer*

OMP: Proteína de membrana externa

PAMP: Padrão molecular associado à patógeno

PBS: Tampão salina fosfato

pb: pares de base

pH: Potencial hidrogeniônico

RPM: Rotações por minuto

SFB: Soro fetal bovino

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

Th1: *T helper 1*

Th17: *T helper 17*

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

TRAF6: Fator 6 Associado ao receptor de TNF

TRAM: molécula adaptadora relacionada à TRIF

TRIF: Adaptador indutor de interferon- β que contém o domínio TIR

TLR: Receptores do tipo Toll

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

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

UFC: unidades formadoras de colônia

Resumo

A Cinase Associada ao Receptor de Interleucina-1 4 (IRAK-4) é uma proteína cinase que possui um papel fundamental na resposta imune, como mediadora da sinalização intracelular via receptor de IL-1 e receptores do tipo Toll (TLR). Este trabalho teve como objetivo determinar a participação de IRAK-4 na resposta imune inata durante a infecção causada pela bactéria intracelular *Brucella abortus*. Camundongos deficientes em IRAK-4 (IRAK-4^{-/-}) e camundongos heterozigotos para esta molécula (IRAK-4^{+/-}) foram infectados com *B. abortus* S2308. Foi possível observar, uma semana após a infecção, que os animais IRAK-4^{-/-} apresentaram um maior número de bactérias recuperadas do baço quando comparado aos animais IRAK-4^{+/-}. Entretanto, após 3 e 6 semanas, os animais foram capazes de controlar a infecção de maneira similar aos animais controle. Além disso, foi avaliada *in vivo* e *in vitro* a produção de citocinas pertencentes ao perfil imunológico de resposta do tipo 1, importante para o controle da brucelose. Os animais deficientes em IRAK-4 apresentaram uma menor produção de IL-12 sistêmica, bem como uma menor produção de IFN- γ e TNF- α pelas células esplênicas. Contudo, a maior diferença na produção IFN- γ entre os animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} foi observada na 1ª semana de infecção, coincidente com a maior susceptibilidade dos animais IRAK-4^{-/-} neste período. Essa redução da produção de IFN- γ pelos camundongos IRAK-4^{-/-} foi observada em linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e em células NK1.1⁺/CD3⁻, indicando a participação de IRAK-4 na ativação destes tipos celulares. A produção de IL-12 e TNF- α , analisada no sobrenadante dos macrófagos e células dendríticas dos animais IRAK-4^{-/-}, foi drasticamente reduzida. Além disso, a fosforilação das MAP cinases, ERK1/2 e p38, e da subunidade p65 do NF- κ B em macrófagos provenientes de animais IRAK-4^{-/-} estimulados com *B. abortus*, demonstrou ser dependente de IRAK-4. Paralelamente, observou-se ainda

um total bloqueio da ativação dessas vias nos macrófagos deficientes em MyD88. Os resultados obtidos demonstram que IRAK-4 é crucial para o controle inicial da infecção por *B. abortus*, porém o controle da infecção em fases mais tardias demonstrou não ser dependente desta molécula.

Abstract

Interleukin-1 receptor associated kinase 4 (IRAK-4) is a kinase that plays an important role in immune responses as a mediator on cellular signaling in responses to IL-1 receptor and various TLR ligands. This study aimed to determine the role of the IRAK-4 in host innate immune response against *Brucella abortus* infection. IRAK-4 knockout mice (IRAK-4^{-/-}) and heterozygous mice (IRAK-4^{+/-}) were infected with *Brucella abortus* strain S2308. Herein, it was shown that the number of colony-forming units (CFU) in IRAK-4^{-/-} mice spleen was higher compared to IRAK-4^{+/-} animals only at one week post-infection. At 3 and 6 weeks post-infection, knockout mice were able to control the infection as the heterozygous mice. Furthermore, it was evaluated in vivo and in vitro production of type 1 cytokines crucial for brucellosis control. IRAK-4 deficient mice (IRAK-4^{-/-}) showed lower production of systemic IL-12, and lower production of IFN- γ and TNF- α by spleen cells when compared to IRAK-4^{+/-} mice. However, the difference in IFN- γ production between IRAK-4^{+/-} and IRAK-4^{-/-} animals was higher only at first week post-infection, in agreement with the increased susceptibility of IRAK-4^{-/-} mice. That reduction of IFN- γ production by IRAK-4^{-/-} mice was observed in CD4⁺, CD8⁺ T cells and NK1.1⁺CD3⁻ cells, indicating the involvement of IRAK-4 in activation of those cells. Also, the production of IL-12 and TNF- α by macrophages and dendritic cells from IRAK-4^{-/-} mice was abolished at 24hrs after stimulation with *B. abortus*. Additionally, macrophages from IRAK-4^{-/-} mice stimulated with *B. abortus*, showed a deficient phosphorylation of MAPK, ERK1/2 and p38, and p65 subunit of NF- κ B. Furthermore, macrophages from MyD88 deficient mice also demonstrated total absence of MAPK and NF- κ B activation. Therefore, the results summarized in this study suggest that the IRAK-4 molecule is critical to trigger the initial immune response against *B. abortus* but not to late phases of infection.