

1. Introdução

1.1. O gênero *Brucella* e a Brucelose

1.1.1. A descoberta da Brucelose

A brucelose é uma zoonose causada pelas bactérias do gênero *Brucella* que são capazes de infectar o homem e os animais domésticos. Em antigos relatos, já existia sinais de infecção pelas bactérias desse gênero colocando a brucelose como uma doença infecciosa que acompanha a história da humanidade. Acredita-se que a brucelose tenha sido a quinta praga do Egito, onde dizimou a população de bovinos local (Pappas *et al.*, 2006).

Em 1859, foi descrita como uma doença que causava fadiga, de origem infecciosa diferente da febre tifóide (Vassalo, 1992). Alguns anos depois esta doença foi denominada 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 (Wyatt, 1999).

Em 1887, na Ilha de Malta, David Bruce isolou o microrganismo que causava essa doença, difícil de diferenciar clinicamente de outras febres endêmicas existentes no litoral Mediterrâneo. O agente etiológico, uma bactéria, foi isolada e denominada *Micrococcus melitensis* (Nicoletti, 2002).

Em 1895, um pequeno cocobacilo gram-negativo foi isolado de tecidos provenientes de um caso de aborto bovino. O descobridor, Berhard Bang, denominou-o *Bacillus abortus*. Estudos com esses dois microorganismos verificaram a grande similaridade entre eles e, diante desse fato, foi decidido homenagear o descobridor deste gênero, denominando-o *Brucella* (Meyer *et al.*, 1990; Nicoletti, 2002).

1.1.2. O gênero *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos gram-negativos, imóveis, que não esporulam e não encapsulam (Corbel & Morgan, 1984). Seu crescimento é aeróbio, mas algumas espécies desse gênero necessitam de uma atmosfera com adição de 5 a 10% de CO₂. Crescem bem a 37°C, em meio rico, com pH entre 6,6 a 7,4. As colônias tornam-se visíveis em meio sólido em 2 a 3 dias (Alton *et al.*, 1988) (Figura 1).



Figura 1: Bactérias do gênero *Brucella*.

A classificação filogenética baseada no seqüenciamento do gene que codifica a subunidade ribossomal 16S das bactérias desse gênero (Moreno *et al.*, 1990), posicionou essas bactérias na classe α -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).

Atualmente existem oito espécies descritas dentro do gênero *Brucella* que apresentam hospedeiros preferenciais: *Brucella abortus* isolada de bovinos, *Brucella melitensis* isolada de caprinos, *Brucella ovis* isolada de ovinos, *Brucella suis* isolada de suínos, *Brucella canis* isolada de caninos, *Brucella neotomae* isolada de um rato do deserto

americano, *Brucella cetaceae* e *Brucella pinnipediae* ambas isoladas de mamíferos marinhos (Freney *et al.*, 2000; Cloeckert *et al.*, 2001 e 2003; Christopher *et al.*, 2011). Recentemente, outras duas espécies foram descritas, *Brucella microti*, isolada de roedores e *Brucella inopinata*, isolada de uma infecção de transplante mamário de seres humanos (Audic *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2010).

Três dessas espécies apresentam risco de infecção para humanos: *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus* (Moreno *et al.*, 2002). *B. canis* também pode infectar o homem, contudo a sua incidência é relativamente baixa (Carmichael, 1990). A *B. melitensis* é a espécie de *Brucella* que apresenta maior virulência para o homem, uma vez que poucas bactérias (10-100) são suficientes para causar a infecção crônica (Solera, 2010). Apesar da *B. melitensis* ser a mais virulenta, a *B. abortus* é a principal fonte de infecção, por ser a espécie mais difundida no mundo (Corbel, 1997).

O gênero *Brucella* apresenta elevada similaridade de sequência de ácidos nucleicos entre as espécies, possuindo homologia de 95% em estudos de hibridização DNA-DNA (Verger *et al.*, 1985). O genoma possui um elevado conteúdo de G+C, em média de 56-58% (Smith & Ficht, 1990). Além disso, o genoma é composto por dois cromossomos circulares, o cromossomo I (2,1Mb) e o cromossomo II (1,15 Mb). Com o sequenciamento completo da linhagem *B. abortus* 9-941 verificou-se que a maioria dos genes essenciais está localizada no cromossomo I (Halling *et al.*, 2005).

As bactérias desse gênero possuem uma membrana celular externa composta principalmente de lipopolissacarídeo (LPS), o qual é considerado um dos principais fatores de virulência desse gênero (Martin & Hancock, 1990). A presença de fosfatidilcolina em sua membrana, um lipídeo típico de membranas eucarióticas, parece também ser necessária para conferir a virulência da *Brucella* (Aktas *et al.*, 2010).

A infecção ocorre quando a bactéria penetra na mucosa dos orifícios nasal, oral ou conjuntival. Depois da penetração, a bactéria é transportada livre ou dentro de células fagocíticas para os linfonodos regionais, onde ocorre hiperplasia e inflamação. A multiplicação e a conseqüente disseminação da *Brucella* para os linfonodos, baço e fígado, onde há formação de granulomas, ocorre via corrente sanguínea e linfa (Alton & Forsyth, 1999).

A *Brucella* tem a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas e não fagocíticas (Detilleux *et al.*, 1990; Jones & Winter, 1992). Contudo, os macrófagos são considerados como as principais células de residência no hospedeiro para este patógeno (Corbel, 1997). A *Brucella* também possui, entretanto, a capacidade de infectar células dendríticas (Billard *et al.*, 2007) ainda que em menor extensão do que os macrófagos (Archambaud *et al.*, 2010).

1.1.3. A Brucelose

A brucelose é uma enfermidade adquirida principalmente pelo contato com animais infectados ou através do consumo de leite e derivados contaminados (Nicoletti *et al.*, 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 (Freney *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas e a gravidade da brucelose podem variar de acordo com a espécie de *Brucella* envolvida. Normalmente, em humanos, na fase aguda da doença os sintomas são febre ondulante, dores de cabeça, mialgia, fadiga e perda de peso (Solera, 2010). Já a brucelose crônica pode levar a endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas. Nos animais domésticos a brucelose afeta principalmente os órgãos reprodutivos, causando aborto e infertilidade temporária (Young, 1988). A taxa de

mortalidade da brucelose humana é baixa (2 - 5%) e está associada com o diagnóstico tardio e estabelecimento de endocardite e complicações neurológicas (Pappas *et al.*, 2005).

A brucelose, atualmente, constitui-se um grave problema para a sanidade animal, afetando ainda a saúde pública da população. Apesar de ser uma doença antiga, ela continua prevalente em vários países pelo mundo. As áreas mais afetadas são a região do Mediterrâneo, o Oriente Médio, Arábia Saudita, México, América Central e do Sul, Ásia central e Índia (Pappas *et al.*, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a cada ano são diagnosticados cerca de 500 mil casos de brucelose humana, no mundo.

No Brasil, a prevalência da brucelose animal é em torno de 5%, e estima-se que o prejuízo causado por esta enfermidade seja de mais de 30 milhões de dólares por ano para a economia nacional (Poester, 2002). Para o estado de Minas Gerais a prevalência de animais soropositivos para a brucelose é de 1,1% (Gonçalves *et al.*, 2009).

1.1.4. Patogênese

A patogênese causada pela infecção com a *Brucella* está associada a sua capacidade de evitar mecanismos extracelulares de defesa do hospedeiro, como anticorpos e complemento, e proliferar dentro dos macrófagos (Sangari & Agüero, 1996). No interior destas células, a *Brucella* tem a capacidade de inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, evitando a sua destruição por enzimas proteolíticas e pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (Pizaro-Cerdá *et al.*, 1998).

A *Brucella* entra na célula hospedeira por meio de microdomínios de lipídeos, existentes na membrana da célula. Utilizando este mecanismo, a *Brucella* consegue evitar a fusão fagossomo/lisossomo (Figura 2). Isto parece ser a chave da sobrevivência deste patógeno em macrófagos infectados, já que as células do hospedeiro com os

microdomínios alterados por substâncias químicas são capazes de eliminar todas as bactérias fagocitadas (Jimenez de Bagues *et al.*, 2005).

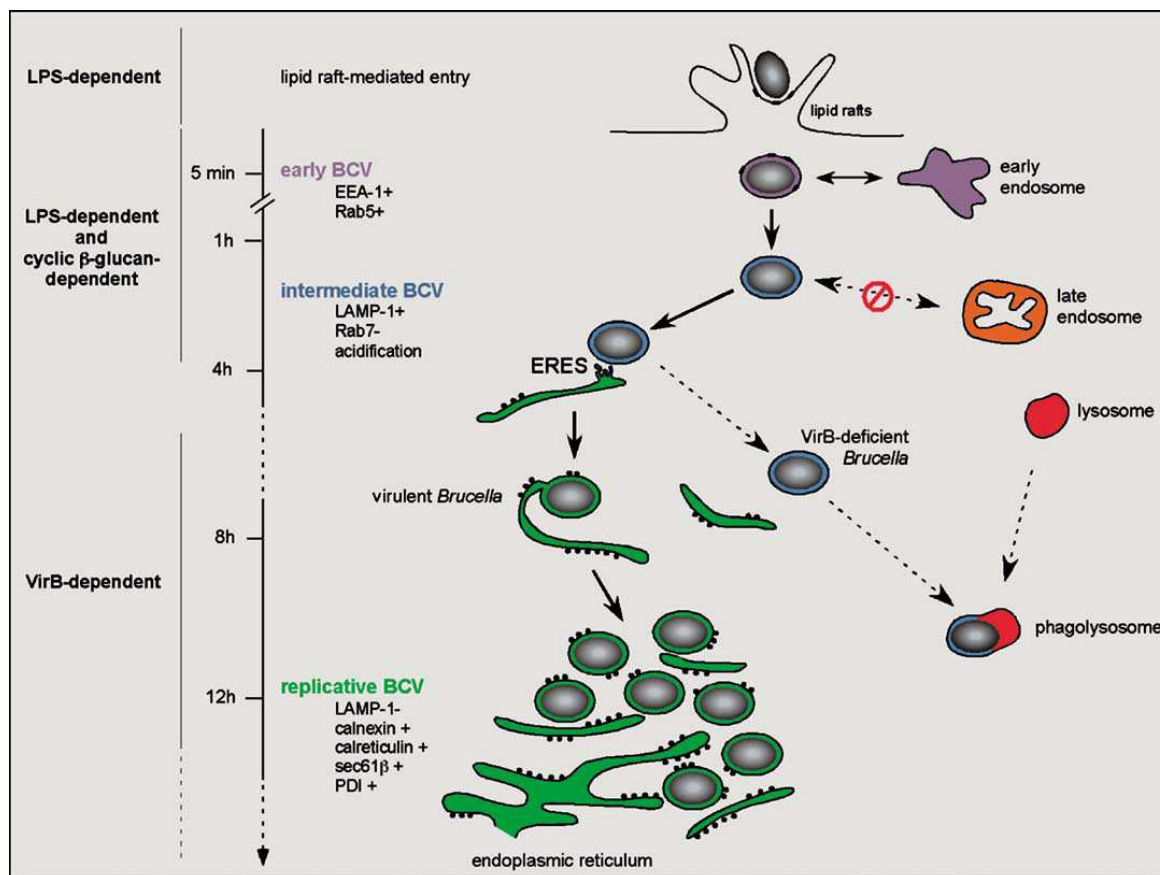


Figura 2: Tráfego intracelular da *Brucella* (Celli, 2006).

No interior das células, as cepas virulentas da bactéria redirecionam o tráfego do fagossomo por meio de um caminho único, alcançando o seu nicho de replicação. Embora esse processo seja heterogêneo, de acordo com o tipo celular, as cepas atenuadas da bactéria, usualmente, não conseguem redirecionar o tráfego e acabam sendo destruídas 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 & Moreno, 2002). Este mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro torna-se a principal base para o estabelecimento da infecção crônica.

1.2. A resposta imune na Brucelose

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 outras ações efetoras do sistema imune (Abbas *et al.*, 2008). Dessa maneira, os mecanismos necessários para combate da infecção pela *Brucella*, um patógeno intracelular, envolvem esse tipo de estratégia. Basicamente, uma efetiva ativação da resposta imune inata, ativação de uma resposta imunológica de perfil Th1 e ação de linfócitos T CD8⁺, produtores de IFN- γ e citotóxicos, são as principais ações envolvidas no controle da *Brucella*.

1.2.1. A resposta imune inata

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 – padrões moleculares associados aos patógenos) (Albiger *et al.*, 2007). A ligação destes PAMPs aos seus receptores dispara sinais que ativam as células apresentadoras de antígenos (APC) e facilitam a fagocitose da bactéria (Akira, 2006). Dessa maneira, o reconhecimento de microrganismos intracelulares como a *Brucella* por células da imunidade inata, tais como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação dessas células. Essa ativação aumenta a eficiência da apresentação antigênica além de induzir a produção de citocinas como TNF- α e IL-12 que possuem várias ações em diferentes tipos celulares (Abbas *et al.*, 2008).

Várias famílias de receptores têm sido identificadas como responsáveis por este reconhecimento inicial, tais como a família dos receptores NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain*) e a família dos receptores do tipo Toll (TLR) (Inohara & Nunes,

2003; Medzhitov et al., 1997). Os TLRs já foram relacionados ao reconhecimento da *Brucella* e desencadeamento da resposta imunológica em resposta a este patógeno.

1.2.1.1. Os receptores do tipo Toll e o seu papel na resposta imune inata contra a *Brucella*

Os receptores do tipo Toll (TLRs) são proteínas transmembrana 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, 2006). O reconhecimento de componentes microbianos pelos TLRs inicia uma cascata de transdução de sinal que desencadeia na expressão de vários genes controladores da imunidade inata e adquirida (Re & Strominger, 2004). Atualmente, existem 13 TLRs descritos em mamíferos. Destes, 10 TLRs são funcionais em humanos e 12 em camundongos (O'Neill, 2008; Zhu & Mohan, 2010). Os receptores TLR-1 ao TLR-9 são conservados em humanos e camundongos, enquanto que o TLR-10 não é funcional em camundongos e os TLR-11, TLR-12 e TLR-13 não estão presentes no genoma humano (Kawai & Akira, 2009) (Figura 3).

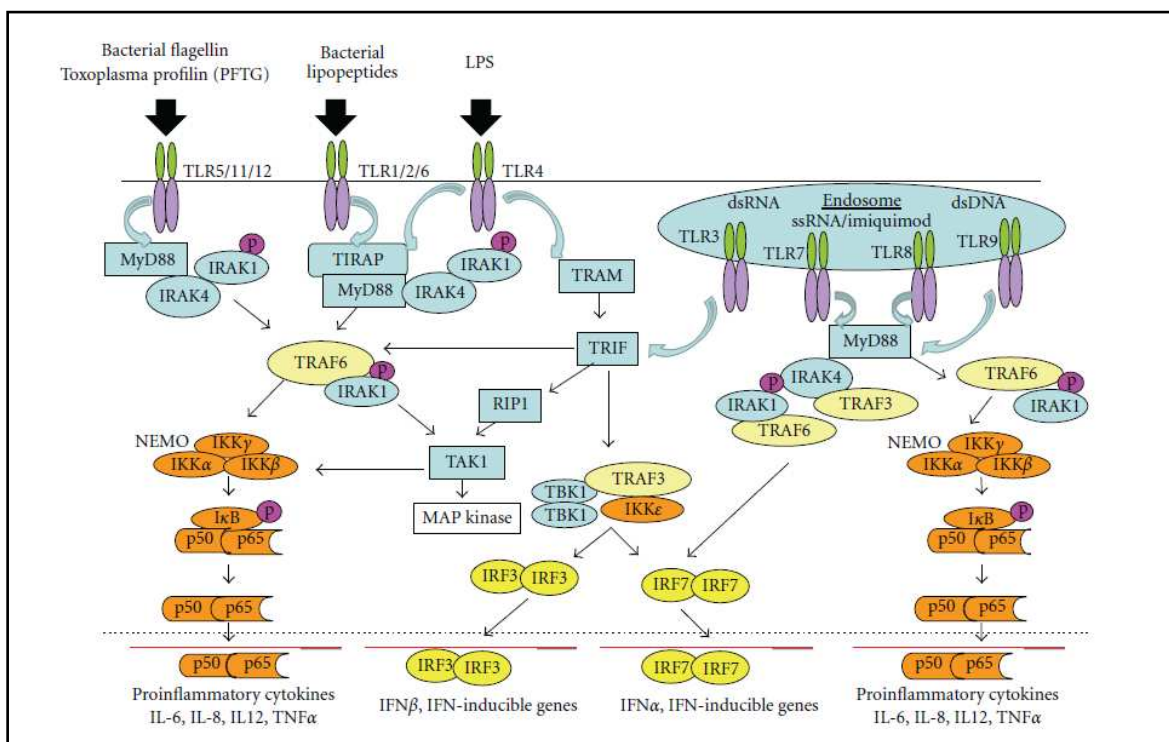


Figura 3: Sinalização via os receptores do tipo Toll (TLR) (Zhu & Mohan, 2010).

Sob reconhecimento do ligante cognato, cada TLR desencadeia respostas distintas em associação com uma combinação diferente de quatro adaptadores contendo o domínio TIR (MyD88, MAL/TIRAP, TRIF ou TRAM), por meio de interações homofílicas desses domínios (Akira, 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 (cinase associada ao receptor de interleucina-1) 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-β (IκB cinase), e as MAP cinases (MAPK). A fosforilação de IKK-β culmina com a fosforilação e degradação de IκB. Por sua vez, a degradação IκB permite o fator nuclear κB (NF-κB - *nuclear factor κB*) ser translocado ao núcleo, e como fator de transcrição ativar múltiplos genes de citocinas pró-inflamatórias

como IL-12 e TNF- α . Além disso, a fosforilação das MAP cinases (ERK1/2, p38 e JNK), também leva a produção de citocinas pró-inflamatórias (O'Neill & Bowie, 2007).

Além de MyD88, tem sido descrita uma outra via de sinalização conhecida como via independente de MyD88 e que utiliza os adaptadores TRIF (adaptador contendo domínio TIR e indutor de IFN- β) e TRAM (molécula adaptadora relacionada à TRIF) na sinalização, culminando em resultados distintos daqueles obtidos com a via dependente de MyD88 (Akira *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003a; Yamamoto *et al.*, 2003b). Os receptores TLR3 e TLR4, são capazes de utilizar essa via de sinalização independente do adaptador MyD88 (Yamamoto *et al.*, 2003a). A via de sinalização de TLRs MyD88-independente, é capaz de induzir a fosforilação de fatores reguladores de interferon (IRFs), como IRF-3 e IRF-7, culminando na produção de interferons do tipo I, em particular IFN- β (Fitzgerald *et al.*, 2003). A produção de IFN do tipo I, por sua vez, culmina com a 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 & Akira, 2007).

Alguns trabalhos evidenciaram a participação dos receptores do tipo Toll no reconhecimento da *Brucella* e de seus componentes, desencadeando uma ativação da resposta imune inata (Figura 4).

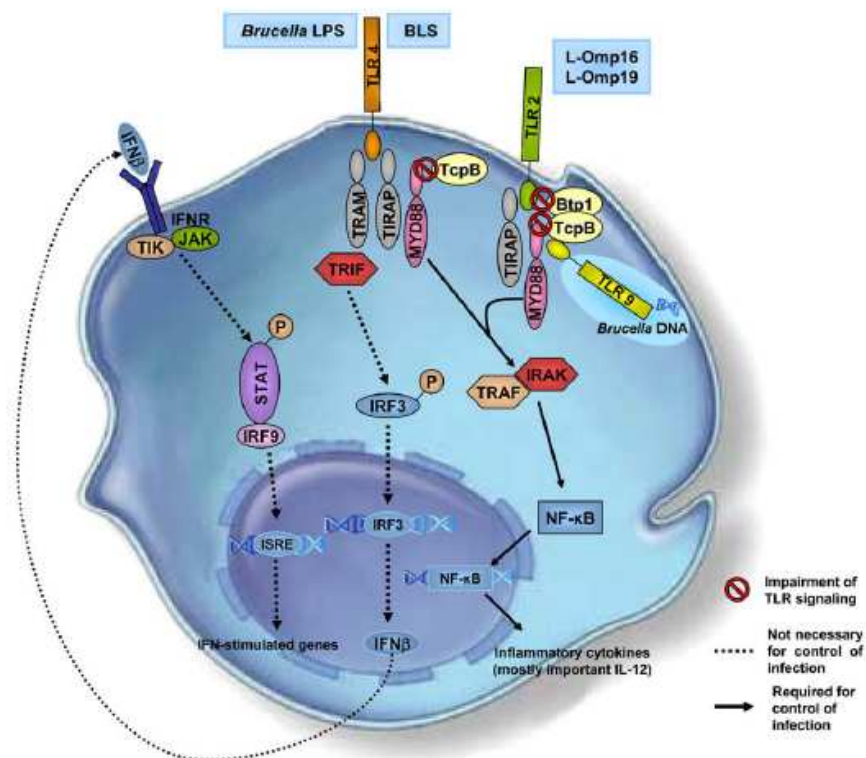


Figura 4. Sinalização celular via TLRs em resposta à infecção por *Brucella* em macrófagos ou células dendríticas.

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, MAP cinases e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. (Oliveira *et al.*, 2008).

O primeiro estudo evidenciando o envolvimento de TLRs na resistência a *B. abortus* foi feito utilizando-se camundongos deficientes para a molécula adaptadora MyD88 (Huang *et al.*, 2003). Camundongos MyD88^{-/-} foram incapazes de produzir IL-12 e TNF- α quando estimulados com a *Brucella abortus* inativada pelo calor (HKBa – *heat-killed B. abortus*). Trabalhos do nosso grupo e de outros, relataram o papel de MyD88 na resposta *in vivo*, demonstrando a exarcebação da brucelose murina em camundongos deficientes para tal molécula adaptadora (Weiss *et al.*, 2005; Copin *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2008). Macedo *et al.* (2008) demonstraram também 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 de camundongos MyD88^{-/-} em resposta ao estímulo com HKBa.

O receptor TLR2 tem sido relacionado à expressão de TNF- α em células dendríticas e macrófagos estimulados com HKBa (Huang *et al.*, 2003, Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Contudo, a sinalização via TLR2 não afeta à replicação da *Brucella* em macrófagos (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Além disso, em relação ao controle da infecção *in vivo*, Campos *et al.* (2004) demonstraram que camundongos TLR2^{-/-} são tão resistentes à infecção quanto os camundongos selvagens.

Em relação ao receptor TLR4, o seu papel na resposta imune contra a *Brucella* ainda é controverso. Campos *et al.*, (2004) demonstraram que em macrófagos, a indução de TNF- α e IL-12 mediante ativação pela *Brucella abortus* é dependente de TLR4. A presença deste receptor é ainda necessária para o controle da infecção pela *Brucella*, principalmente 3 e 6 semanas após infecção. A dependência da ativação de TLR4 para produção de TNF- α em macrófagos também foi demonstrada por Weiss *et al.*, (2005) e Barquero-Calvo *et al.*, (2007). No entanto, esses autores não observaram o envolvimento de TLR4 no controle da infecção pela *Brucella abortus*. Isso pode ser explicado, entretanto, pelo uso de diferentes cepas de *Brucella* com diferenças estruturais no lipídeo A que constitui o seu LPS.

Proteínas presentes na membrana externa da *Brucella* (OMP – *outer membrane protein*) podem ser reconhecidas pelos TLR2 e TLR4, desencadeando uma resposta imunológica. As lipoproteínas L-Omp16 e L-Omp19 induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, em células THP-1, de maneira dependente de TLR2 (Giambartolomei *et al.*, 2004). Já a forma não lipidada da Omp16 (U-Omp16) da *B. abortus* foi capaz de induzir uma resposta Th1 protetora de maneira dependente de TLR4. De maneira interessante, a Omp-16 apresentando somente a sua parte protéica foi capaz de induzir essa resposta via

TLR4, apresentando-se como um novo agonista não lipídico para esse receptor (Pasquevich *et al.*, 2010). A forma não lipídica da Omp 19 (U-Omp19), também demonstrou ser capaz de gerar uma resposta Th1 protetora, quando essa proteína foi administrada via intraperitoneal. No entanto, essa resposta de perfil Th1 foi induzida de maneira independente do receptor TLR4 (Pasquevich *et al.*, 2011).

Já o TLR9, também está envolvido no reconhecimento e desencadeamento da sinalização da resposta imune inata para o controle da infecção pela *Brucella*. Macrófagos e células dendríticas de camundongos TLR9^{-/-} produzem menos IL-12 quando comparados ao controle, após ativação com a *Brucella*. Contudo a produção de TNF- α não é afetada (Huang *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2008). Em células dendríticas, a produção de IL-12 induzida pela *Brucella* e parcialmente dependente de TLR9, está relacionada ao reconhecimento do DNA da *Brucella* por este receptor (Huang *et al.*, 2005). Além disso, um papel proeminente tem sido conferido ao TLR9 em relação ao controle *in vivo* da infecção por *B. abortus*, uma vez que camundongos deficientes em TLR9 são mais susceptíveis à infecção por esta bactéria quando comparados aos camundongos deficientes em TLR2, TLR4 e TLR6. O número de bactérias recuperadas no baço dos animais TLR9^{-/-} foi 1 log superior ao número de bactérias detectadas no baço dos animais selvagens (Macedo *et al.*, 2008).

1.2.1.2. A utilização da sinalização via TLRs pela *Brucella* como mecanismo de escape da resposta imune

A *Brucella* é vista como uma bactéria fraca indutora da produção de citocinas pró-inflamatórias, quando se comparado com outras bactérias gram-negativas como *Salmonella* (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Isto é devido ao fato de que a *Brucella* utiliza de alteração dos seus PAMPs como forma de promover o escape da resposta imunológica. Um exemplo disso é o seu LPS, considerado como não canônico, quando comparado ao LPS de outras

bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* (Moreno *et al.*, 1981). O reconhecimento do LPS da *Brucella* pelo sistema imune, assim como o LPS de *E. coli*, é mediado pelo receptor do tipo Toll 4 (Campos *et al.*, 2004). Apesar desse reconhecimento, a resposta desencadeada pelo LPS de *Brucella* é 100 a 1000 vezes menos intensa se comparada a outras bactérias gram-negativas (Giambartolomei *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2005).

Uma diferença presente na estrutura do LPS da *Brucella* se encontra na região denominada de lipídeo A. O lipídeo A da *B. abortus* possui uma cadeia de diaminoglicose amida ao invés de glicosamino, os grupos acil são mais longos (C18-C19, C28 ao contrário de C12-C14) e somente estão ligados ao core por meio de ligações amida (ao contrário de ligações éster e amida) (Moriyon *et al.*, 2003). Estas propriedades conferem ao LPS da *Brucella* uma baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação por macrófagos e proteção contra as respostas imunológicas do hospedeiro (Forestier *et al.*, 2000).

A *Brucella* também induz uma fraca resposta mediada pelo TLR5. O receptor TLR5 tem como agonista a proteína flagelina, presente no flagelo das bactérias. Na *Brucella*, a flagelina possui uma sequência diferenciada nos aminoácidos 89-96, presente no domínio N-terminal, que leva a uma fraca ligação no receptor TLR5 (Andersen-Nissen *et al.*, 2005, Jong *et al.*, 2010).

Além disso, uma nova família de moléculas bacterianas foi recentemente identificada como responsável pela subversão do sistema imune inato durante o processo invasivo. A proteína Btp1 (*Brucella TIR protein 1*) isolada da *B. abortus* e a proteína TcpC da *B. melitensis*, assim como a proteína TlpA de *E. coli* e *S. enterica* serovar Enteritidis apresentam alta similaridade de sequência de aminoácidos do domínio TIR característico das proteínas da família de receptores Toll/IL-1 (Diacovich & Gorvel, 2010). Estas proteínas possuem a capacidade de interferir com a sinalização mediada pelos TLRs (Cirl *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2008). Especificamente, Btp1 e TcpC interferem com a

ativação da resposta dependente de TLR2 ao promover a degradação do adaptador MAL/TIRAP, impedindo assim a ativação de NF- κ B via esse receptor (Salcedo *et al.*, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2009) (Figura 5).

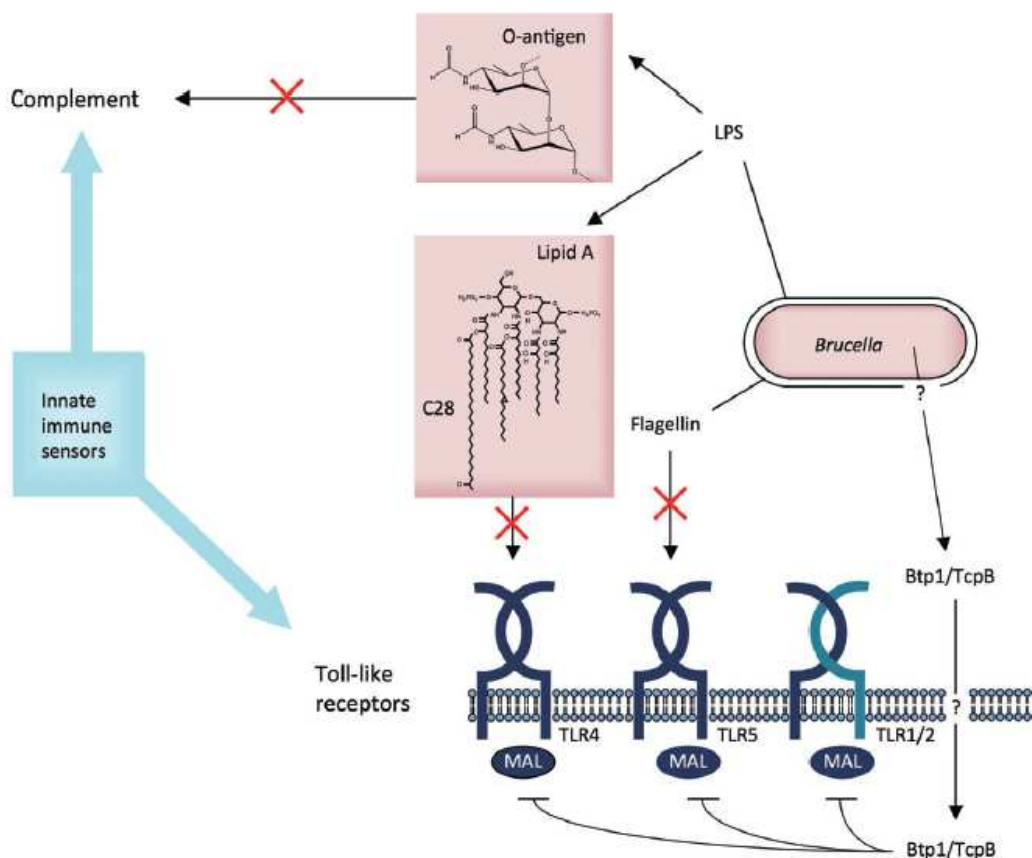


Figura 5. Evasão da resposta imune inata pela *Brucella* spp. por meio da regulação das vias de ativação dos receptores TLRs. (Jong *et al.*, 2010).

1.2.1.3. Células e outros mediadores envolvidos na resposta imune inata contra a *Brucella*

A imunidade inata funciona como a primeira linha de defesa contra infecções e consiste de barreiras epiteliais, fagócitos (como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), células NK (*natural killer*) e proteínas como as do sistema de complemento e citocinas (Abbas *et al.*, 2008).

O reconhecimento da *Brucella* por células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação dessas células e concomitante produção de citocinas pró-inflamatórias. Os macrófagos possuem uma importância especial na resposta contra *Brucella*, uma vez que são as principais células reservatórios de sobrevivência e replicação da bactéria (Sangari & Agüero, 1996). Após reconhecimento da *Brucella*, os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12. A produção dessas citocinas pró-inflamatórias tem sido vista como um importante mecanismo para o controle da brucelose (Ugalde *et al.*, 2003, Bessoles *et al.*, 2009). As células dendríticas também participam da resposta imune inata frente à infecção pela *Brucella*, já que esta bactéria é capaz de infectar estas células e a estimulação de células dendríticas com *B. abortus* induz a produção de IL-12 e migração dessas células para áreas de células T no baço, promovendo assim a apresentação de antígenos da *Brucella* em um microambiente rico em IL-12 (Huang *et al.*, 2001, Billiard *et al.*, 2007).

Neste contexto, a citocina IL-12 tem como efeito estimular linfócitos T CD4⁺ e células NK a secretarem IFN- γ . A produção de IFN- γ por estas células ativa o macrófago induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e TNF- α culminando com a morte da bactéria (Golding *et al.*, 2001). A importância da citocina IL-12 foi evidenciada, uma vez que a depleção endógena de IL-12 exacerba a infecção pela *Brucella* e que isto está relacionado à diminuição da produção de IFN- γ pelas células T esplênicas e consequentemente diminuição da ativação do macrófago (Zhan & Cheers, 1995). Além disso, uma menor expressão do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) parece ser o mecanismo que leva a maior susceptibilidade natural de camundongos Balb/c à infecção pela *Brucella* (Sathiyaseelan *et al.*, 2006).

Em relação às células NK, estas células podem, sob efeito da ativação de IL-12, produzir IFN- γ e dessa maneira contribuir para o controle da infecção pela *Brucella*. No

entanto, a depleção de células NK *in vivo* não altera a capacidade de camundongos em controlar a infecção pela *Brucella* o que evidencia que outros mecanismos são capazes em conter a infecção mesmo na ausência das células NK (Fernandes *et al.*, 1995). O papel das células NKT na resposta imune contra a *Brucella* também já foi avaliado. A multiplicação da *Brucella* no interior de macrófagos é impedida na presença de células CD4⁺ iNKT e este impedimento é dependente da interação com CD1d presente na superfície dos macrófagos. Além disso, essas células CD4⁺ iNKT induzem a apoptose dos macrófagos por meio da ativação da via Fas-FasL e da liberação de grânulos citolíticos (Bessoles *et al.*, 2009).

Ademais, a participação dos neutrófilos na resposta imune durante a infecção pela *Brucella* já foi descrita. Foi observado que a *B. abortus* induz a ativação de neutrófilos humanos por meio do aumento da expressão nessas células de CD35 e CD11b, bem como diminuição da expressão CD62L com a secreção de IL-8 (Zwerdling *et al.*, 2009).

1.2.2. A resposta imune adquirida

Na imunidade adquirida contra a infecção por *B. abortus* em camundongos, os anticorpos têm o papel de opsonizar o agente infeccioso (Cheers & Ho, 1983), tornando a fagocitose pelos macrófagos mais eficiente (Winter *et al.*, 1989). Entretanto, os anticorpos não reduzem a taxa de crescimento intracelular da bactéria *in vivo*, e não conferem resistência a camundongos susceptíveis. A habilidade da *B. abortus* de sobreviver e replicar dentro do macrófago e de 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).

As células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ possuem um importante papel no controle da brucelose principalmente em fases iniciais da infecção (Golding *et al.*, 2001; Pasquali *et al.*, 2001). Os linfócitos do tipo Th1 secretam IFN- γ como principal citocina efetora contra infecções causadas por bactérias intracelulares, incluindo a *Brucella* (Jones & 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 efectoras dos macrófagos (Abbas *et al.*, 2008). A importância do IFN- γ foi demonstrada ainda, quando camundongos deficientes em IFN- γ e infectados com *B. abortus* apresentaram um aumento de 100 vezes no número de bactérias recuperadas do baço em relação aos animais selvagens, 6 semanas após a infecção. Após este período os animais não foram capazes de sobreviver (Murphy *et al.*, 2001). Neste mesmo estudo, os autores observaram que para controle da brucelose murina, o mais importante é que a produção de IFN- γ se perdesse por o todo o período da infecção, uma vez que camundongos Balb/c que são mais susceptíveis à infecção pela *Brucella*, são capazes de produzir IFN- γ na primeira semana após a infecção, entretanto, esta produção é reduzida em períodos mais tardios.

A contribuição das células T CD8⁺ e CD4⁺ no controle da brucelose foi efetivamente determinada por Oliveira & Splitter (1995), monitorando o número de bactérias no baço de camundongos geneticamente deficientes para os genes de MHC de classe I e II, durante quatro semanas após a infecção. Foi demonstrado um papel predominante dos linfócitos T CD8⁺ no controle da brucelose murina, já que animais deficientes para β 2-microglobulina, que por sua vez não possuem linfócitos T CD8⁺, são

mais susceptíveis a infecção pela *B. abortus* do que animais selvagens e os animais deficientes em linfócitos T CD4⁺.

As células T $\gamma\delta$, também possuem um papel no controle da brucelose. As células T $\gamma\delta$ são uma pequena subpopulação de células T que, em geral não reconhecem antígenos como os peptídeos apresentados pelas moléculas do MHC (Murphy *et al.*, 2010). Em seres humanos, durante estágios iniciais da infecção pela *B. suis*, foi observado que há um aumento das células T V γ 9V δ 2 na corrente sanguínea de pacientes infectados. Em experimentos *in vitro*, estas células foram capazes de produzir TNF- α e IFN- γ , bem como possuíam atividade citolítica quando co-cultivadas com macrófagos infectados. Esta ação citolítica demonstrou ser dependente de contato, por meio da ativação da via Fas-FasL (Otones *et al.*, 2000; Oliaro *et al.*, 2005; Dudal *et al.*, 2006).

1.3. A proteína IRAK-4 e o seu papel na sinalização via TLRs

A ativação de TLRs leva o recrutamento de uma molécula adaptadora contendo o domínio TIR, o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), ao receptor ativado (Yamamoto *et al.*, 2004). Membros da família de cinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK), são então recrutadas ao complexo do receptor, por meio de uma interação homotípica com MyD88 (Janssens & Beyaert, 2003; Lye *et al.*, 2004). As proteínas da família IRAK têm demonstrado um papel integral nas vias de sinalização via TLR, dependente de MyD88, e do receptor de IL-1. No entanto, ainda não é claro se, e em qual extensão, essas proteínas estão envolvidas na sinalização independente de MyD88 (Lye *et al.*, 2008).

Já foram descritos quatro membros da família de proteínas IRAK: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-3 (também conhecida como IRAK-M) e IRAK-4 (Cao *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1997, Weshe *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2002) (Figura 6).

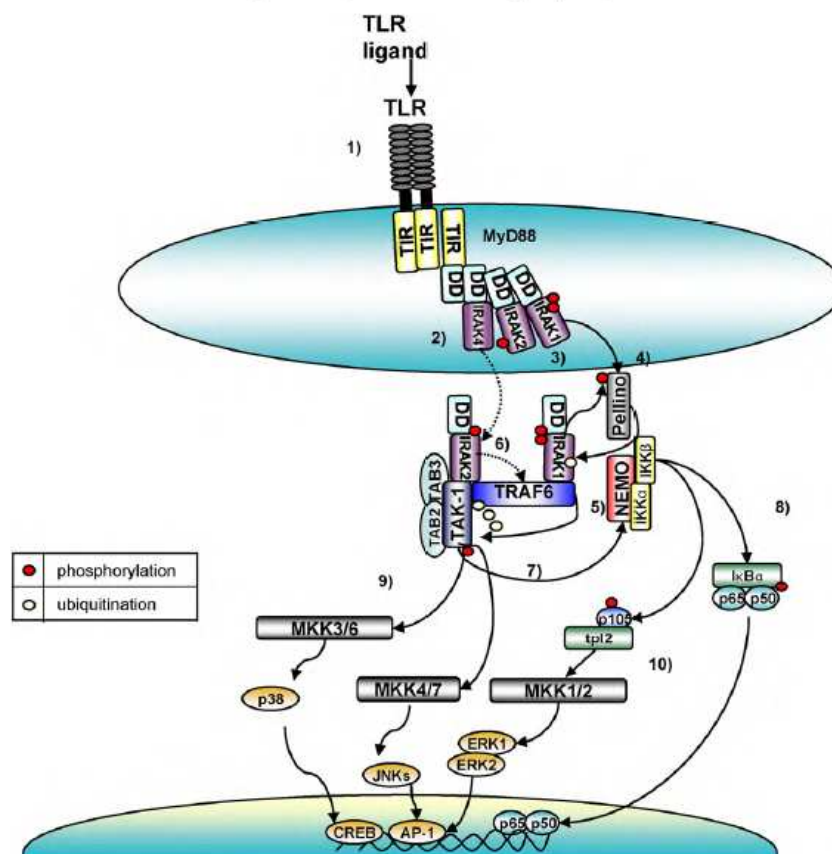


Figura 6: Participação das IRAKs na ativação de NF-κB e MAP cinases induzida pela via dos TLRs dependente de MyD88 (Flannery & Bowie, 2010).

Ao primeiro membro dessa família a ser descrito, IRAK-1, foi conferido um papel mediador da sinalização por IL-1 (Cao *et al.*, 1996). Entretanto, camundongos e células deficientes para o IRAK-1 demonstraram uma resposta a IL-1 apenas parcialmente defeituosa (Kanakaraj *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999).

Em 1997, foi descoberto um novo membro da família, denominado então como IRAK-2 e também considerado como mediador da sinalização via IL-1 (Muzio *et al.*, 1997). Estudos têm demonstrado que IRAK-2 não é necessário para a ativação precoce de NF-κB, porém é necessário para a ativação tardia desta molécula, exercendo um papel redundante a IRAK-1 (Kawagoe *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2009).

O terceiro membro da família IRAK a ser descrito foi denominado IRAK-3 ou IRAK-M (Weshe *et al.*, 1999). Inicialmente esta proteína foi relacionada à indução da resposta inflamatória, como membro da sinalização via IL-1 e TLRs. Entretanto, atualmente, sabe-se que IRAK-M é uma proteína reguladora da sinalização e não indutora. A ausência de IRAK-M confere um fenótipo de aumento da resposta inflamatória (Kobayashi *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2010).

O último membro dessa família a ser descrito e, molécula alvo deste estudo é a proteína cinase IRAK-4 (Li *et al.*, 2002). O envolvimento de IRAK-4 na cascata de transdução de sinal dependente de MyD88 é visto como central. Suzuki *et al.*, 2002a, mostraram que a molécula IRAK-4 é essencial para a via de sinalização de receptores IL-1 e sinalização via TLR, uma vez que camundongos e células deficientes em IRAK-4 possuem a produção de citocinas, como TNF- α e IL-6, comprometida.

Estudos, utilizando-se a luciferase como gene repórter, investigaram a posição de IRAK-4 na cascata de sinalização dependente de MyD88. Os resultados indicaram que MyD88 e MAL são mediadores *upstream* que requerem IRAK-4 para a transdução de sinal, enquanto que TRAF-6 transmite o sinal *downstream* à molécula IRAK-4 (Suzuki *et al.*, 2002a). A transmissão desse sinal pela molécula IRAK-4 parece ser dependente de sua atividade de cinase durante a resposta imune inata (Lye *et al.*, 2008), uma vez que a atividade cinase de IRAK-4 é necessária para a fosforilação inicial de IRAK-1. Após ser fosforilado por IRAK-4, IRAK-1 torna-se capaz de se autofosforilar e manter a transdução de sinal (Suzuki *et al.*, 2002b).

A importância da atividade de cinase da proteína IRAK-4 também foi observada por Kim *et al.*, (2007). Neste estudo, foi demonstrado que camundongos, que possuíam IRAK-4 com a sua atividade de cinase inativa, eram resistentes ao choque séptico induzido por LPS e CpG, indicando um bloqueio da indução de citocinas pró-inflamatórias via

TLRs. Esses autores observaram ainda, que os macrófagos derivados de medula óssea destes animais, não tinham afetada a ativação de NF- κ B, porém apresentavam uma redução na estabilidade de mRNAs diante da indução por LPS, R848 e IL-1, o que possivelmente explicaria a redução na produção de citocinas. Além disso, foi demonstrado que a produção de citocinas foi reduzida em macrófagos e células dendríticas que possuíam IRAK-4 sem a sua atividade de cinase, quando estas células foram estimuladas com LPS e outros agonistas dos TLRs (Lye *et al.*, 2008).

Outra via dependente de MyD88, a via de ativação do receptor da IL-18, também demonstrou ser dependente de IRAK-4. Suzuki *et al.*, (2003) observaram que a atividade citotóxica das células NK quando estimulados por IL-18 foi dependente de IRAK-4, bem como a ativação de uma resposta de perfil Th1 em resposta à IL-18.

A molécula IRAK-4 está envolvida ainda em mecanismos de sinalização em neutrófilos. Brzezinska *et al.*, (2008), demonstraram que neutrófilos deficientes em IRAK-4 possuíam uma redução da exocitose em resposta ao LPS. Além disso, pacientes portadores de uma deficiência autossômica recessiva de IRAK-4 apresentaram significativos defeitos na migração e fagocitose de neutrófilos (Bouma *et al.*, 2009) revelando o papel de IRAK-4 neste tipo celular.

A ativação de linfócitos pela via do receptor TCR também parece envolver IRAK-4. Esta molécula demonstrou ser essencial na ativação de eventos de sinalização celular específicos após ativação do TCR e estes eventos por sua vez, levam a ativação de NF- κ B (Suzuki *et al.*, 2006; Lye *et al.*, 2008). Em outro estudo, foi demonstrado que IRAK-4 é uma importante molécula na ativação de NF- κ B e MAP cinases (Kawagoe *et al.*, 2007). No entanto, em estudos *in vitro*, esses autores observaram que IRAK-4 parece não ser fundamental na ativação da sinalização via TCR.

A importância de IRAK-4 no controle de doenças infecciosas vem sendo relatada *in vitro* e *in vivo*. Células dendríticas plasmocitóides, que apresentavam IRAK-4 com sua atividade de cinase inativa, não foram capazes de produzir IFN do tipo I quando estas células foram infectadas pelo vírus Influenza (Kim *et al.*, 2007). Ademais, camundongos deficientes em IRAK-4 infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) demonstraram uma deficiência na produção de IFN- γ . Houve uma redução na produção de IFN- γ pelas células NK nesses animais, porém a capacidade citolítica dessas células não foi afetada (Suzuki *et al.*, 2002a). Para avaliar a participação de IRAK-4 no controle de infecções bacterianas, animais deficientes em IRAK-4 foram infectados com 1×10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus aureus*. Uma grande susceptibilidade à infecção foi observada, uma vez que os camundongos IRAK-4^{-/-} morreram em um período de 10 dias após a infecção demonstrando a importância de IRAK-4 no controle de infecções *in vivo* (Suzuki *et al.*, 2002a).

A deficiência autossômica recessiva de IRAK-4 em seres humanos culmina com um bloqueio da sinalização via TLR em leucócitos e está relacionada a uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas, predominantemente a infecções por bactérias gram-positivas (Bouma *et al.*, 2009). A maioria das infecções observadas em humanos que possuem essa deficiência é causada por *Streptococcus pneumoniae* e algumas por *Staphylococcus aureus*, principalmente na infância (Suhir & Etzione, 2009). McDonald *et al.*, (2010), descreveram um paciente com deficiência em IRAK-4 e que apresentava infecções recorrentes por *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A análise da função das células T nesse paciente revelou um bloqueio da expressão de CD25 e CD69, bem como uma redução da produção de IFN- γ , após a ativação das células T.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Determinar o papel da proteína IRAK-4 na resposta imune contra à infecção causada pela bactéria intracelular *Brucella abortus*.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o papel do receptor IRAK-4 no controle da infecção pela *Brucella abortus in vivo*.
- ✓ Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico em esplenócitos de camundongos deficientes para a molécula IRAK-4 e infectados pela *Brucella abortus* e estimulados com a *B. abortus*, HKBa, e com agonistas dos TLRs.
- ✓ Avaliar o envolvimento dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como das células NK1.1⁺CD3⁻ de camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} infectados, na produção de IFN- γ por meio de citometria de fluxo.
- ✓ Avaliar a contribuição da molécula IRAK-4 na produção de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas e macrófagos infectados com a *B. abortus*.
- ✓ Analisar por *Western Blotting* o perfil de fosforilação das MAP cinases, ERK1/2 e p38, e da subunidade p65 do NF- κ B em macrófagos provenientes de camundongos IRAK-4^{-/-}, IRAK-4^{+/-}, MyD88^{-/-} e C57BL/6 estimulados com *B. abortus* S2308 e com o LPS de *E. coli*.

3. Material e Métodos

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para a molécula IRAK-4 (IRAK-4^{-/-}) e, como controle, animais heterozigotos (IRAK-4^{+/-}) para essa molécula, ambos gentilmente cedidos pelo Dr. Alan Sher, NIH, Bethesda, MD (USA). Para os estudos de sinalização intracelular por *Western Blotting*, também foram utilizados camundongos deficientes em MyD88 (MyD88^{-/-}) gentilmente cedidos pelo Dr. Shizuo Akira (Universidade de Osaka, Osaka, Japão). Os camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB - UFMG. Camundongos C57BL/6 foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB – UFMG (CEBIO). Os animais utilizados possuíam 7 a 12 semanas de idade.

3.1.1. Tipagem dos camundongos

Para confirmar a deficiência genética na molécula IRAK-4, bem como o genótipo heterozigoto, foram extraídos DNA genômico dos camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} a partir de uma porção da cauda desses animais. Para um fragmento de aproximadamente 2 mm da cauda foram adicionados 150 µL de Solução de Lise Alcalina (25 mM de NaOH, 0,2 mM de Na₂EDTA pH 1,2) e as caudas foram submetidas à aquecimento de 95°C por 1 hora, ou até completa digestão. Posteriormente, as caudas digeridas foram resfriadas a 4°C e foram adicionados 150 µL de solução de neutralização (40 mM de Tris-HCl, pH 5,0). O DNA genômico extraído foi quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro e visualizado em gel de agarose 1%.

Para genotipagem foram utilizados os iniciadores com as seguintes seqüências:

A. Iniciador Controle: 5' TCT TCT ACC TGA AAT ATG AAA GAT TCC T 3'

B. Iniciador Mutante: 5' TGA ATG GAA GGA TTG GAG CTA CGG GGG T 3'

C. Iniciador comum: 5' GAA CAC GCT CCC AGG TCT CTT TCC AAC A 3'

O iniciador A se anela em uma região gênica presente somente nos animais que apresentam o gene selvagem. O iniciador B se anela em uma região gênica referente a um cassete de resistência à neomicina presente somente nos animais que apresentam o gene interrompido por este cassete. O iniciador C anela em uma região do gene não interrompida, comum ao gene selvagem e interrompido. Dessa maneira, os Iniciadores A e C foram utilizados para amplificação do gene selvagem e o produto de amplificação gerado foi de 500 pb. A combinação dos iniciadores B e C foi utilizada para amplificação do gene interrompido e o produto da amplificação gerado foi de 600 pb. (Figura 7).

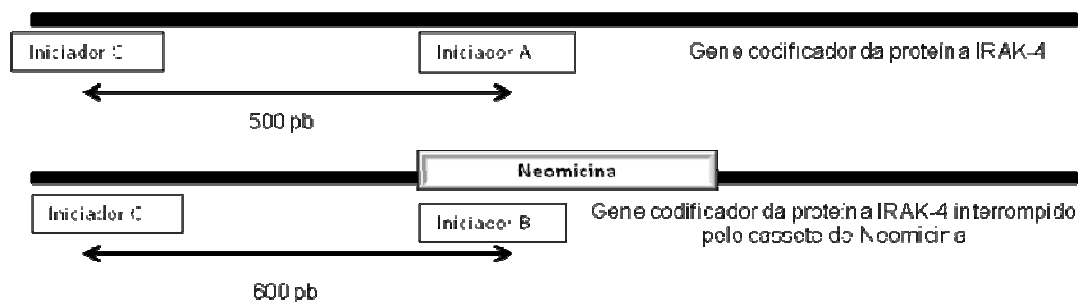


Figura 7: Regiões de anelamento dos iniciadores utilizados para genotipagem dos animais IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-}.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo: tampão 1x, 0,2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 0,25 µM dos iniciadores A ou B e 0,25 µM do iniciador C, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega) e 1 ng/µL de DNA. Foi utilizado o aparelho termociclador (PTC-100, MJ Research Inc.) conforme as seguintes condições: 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos para os iniciadores A e C, e 94 °C por 2

minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos para os iniciadores B e C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.2. Cepas bacterianas

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

3.3. 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 ressuspensionado em tampão salina fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,4 (2,8 mM Na₂PO₄; 7,2 mM 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 por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) visualizadas na placa.

3.3.1. Inativação das bactérias pelo calor

Após ter sido determinada a concentração bacteriana, alíquotas desta suspensão foram colocadas em banho-maria, a 80°C, durante 1 hora e 30 minutos sendo agitadas a cada 15 minutos. Para certificação da inativação das bactérias, amostras foram plaqueadas em meio BB solidificado, e incubadas por 72 horas, a 37°C. As bactérias inativas pelo calor foram referidas neste estudo pela sigla HKBa.

3.4. Infecção *in vivo* e análise da resposta imunológica

Cinco camundongos de cada grupo IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} foram infectados intraperitonealmente com 1x10⁶ UFC da cepa virulenta S2308 da *B. abortus*. Esses camundongos foram sacrificados semanalmente (1, 3 e 6 semanas) após a infecção. Após o sacrifício, o baço foi extraído com o auxílio de pinça e tesoura estéreis.

3.4.1. Determinação do número de UFC

O baço extraído de cada animal foi macerado em 10 mL de solução salina (NaCl 0,8%), com o auxílio de uma malha de aço, e serialmente diluído. As diluições decimais foram plaqueadas, em duplicata, em meio BB ágar. Após 3 dias de incubação à 37°C, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado. Os resultados foram expressos como a média do logaritmo (log) de UFC de cada grupo. O ensaio de determinação de UFC foi realizado 3 vezes.

3.4.2. Determinação da concentração de IL-12p40 no soro

O sangue dos animais infectados foi coletado 3, 7, 10 e 14 dias após infecção pelo plexo retro-orbital. Após coleta, o sangue foi centrifugado por 13000 RPM por 10 minutos para obtenção do soro. O soro foi utilizado para determinação da concentração de IL-12p40 por ELISA.

3.4.3. Obtenção dos esplenócitos

As suspensões de células obtidas após os baços dos camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} serem macerados foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 1200 RPM. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão ACK (0,15 M NH₄Cl, 1,0 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2) e incubadas por 5 minutos, a temperatura ambiente, ocorrendo a lise osmótica das hemácias. Foi acrescentada solução salina às amostras até atingir o volume de 30 mL e estas foram centrifugadas novamente.

Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA) e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina (1 µg/mL, Gibco, Carlsbad, CA) e a concentração das células foi determinada na câmara de Neubauer, utilizando-se o Azul de Trypan 0,02% como corante para visualização das células vivas. As células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC).

3.4.3.1. Cultura de esplenócitos para determinação da produção de citocinas e NO

As células do baço foram infectadas com *B. abortus* S2308 (MOI de 100:1) e estimuladas com *B. abortus* S2308 inativada pelo calor (HKBa) também na MOI de 100:1. Células não estimuladas foram usadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5,0 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e/ou LPS de *Escherichia coli* - agonista de TLR4 (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) serviram como controle positivo. Além disso, foram utilizados agonistas dos TLR2 – Pam3CSK4 (1 µg/mL; InvivoGen, San 104 Diego, CA) e TLR9 - CpG ODN1826 (1 µg/mL, InvivoGen). Após 48 e 72 horas de incubação a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados para a quantificação de TNF-α, IFN-γ por ELISA e óxido nítrico (NO) pelo Método de Greiss.

3.4.3.2. Cultura de esplenócitos para avaliação dos tipos celulares produtores de IFN-γ por citometria de fluxo

As células do baço foram infectadas com *B. abortus* S2308 (MOI de 100:1) e estimuladas com HKBa (MOI de 100:1). As células não estimuladas foram usadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5,0 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como controle positivo. As células foram estimuladas por 40h a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂. Após este tempo, foi adicionada Brefeldina A (1

µg/poço, Sigma-Aldrich, St. Louis) e as células foram incubadas por mais 4h. Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo FcBlock anti-CD16/32 (clone 93; eBiosciences, San Diego, CA) em tampão de FACS (0,15 M PBS, 0,25% BSA, 1 mM NaN₃) por 20 minutos a 4°C, para evitar marcações inespecíficas. A marcação dos receptores de superfície foi feita com incubação por 20 minutos a 4°C com anticorpos monoclonais de superfície apropriados: anti-mouse-CD4 FITC-conjugado (GK1.5 clone; eBiosciences, San Diego, CA), anti-mouse-CD8 Cy5-conjugado (clone 53 - 6.7, eBiosciences, San Diego, CA), anti-mouse-NK1.1 FITC-conjugado (clone PK136, eBiosciences, San Diego, CA), anti-mouse-CD3e Cy5-conjugado (500A2 clone, eBiosciences, San Diego, CA). As células foram então lavadas com PBS e incubadas com Streptoavidina por 20 minutos. Após incubação com a Streptoavidina, as células foram lavadas com PBS-BSA e fixadas com 2% de paraformaldeído (SIGMA). As células foram, posteriormente, permeabilizadas com solução de saponina a 0,5% em PBS e foi realizada a marcação intracelular para IFN-γ com anti-mouse-IFN-γ PE-conjugado (XMG1.2 clone; PharMingen BD, San Diego, CA). Finalmente, as amostras foram lavadas como anteriormente e ressuspensas em PBS. A aquisição das amostras foi realizada utilizando FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA) e foram adquiridos 70000 eventos. A análise foi feita considerando a porcentagem de células produtoras de IFN-γ dentro de cada população utilizando-se o Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

3.5. Extração e cultivo de macrófagos inflamatórios peritoneais (Mφ)

Camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} foram inoculados intraperitonealmente com 2 mL de meio Tioglicolato 3% (Difco). Após quatro dias, estes animais foram sacrificados e 5 mL de meio RMPI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) gelado foram injetados

no interior do peritônio e novamente recolhidos de forma a realizar uma lavagem peritoneal para recuperação de macrófagos. Este meio, contendo os macrófagos, foi centrifugado a 1200 RPM por 10 minutos, a 4°C. As células foram ressuspendidas em RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 25 mM de HEPES, 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT), 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina (1 µg/mL, Gibco, Carlsbad, CA). Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o Azul de Trypan 0,02% como corante para visualização das células vivas.

Os macrófagos inflamatórios peritoneais (M ϕ) foram plaqueados em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC) na concentração de 1×10^6 células/poço em um volume final de 150 µL. A cultura foi então incubada a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂ por 3 horas para aderência dos macrófagos. As células não aderentes foram removidas por lavagem e foram adicionados 150 µL de RPMI/poço. Posteriormente, estas células foram estimuladas com *B. abortus* S2308 (MOI 10³:1), HKBa (MOI 10³:1), agonistas de TLR-2 – Pam3CSK4 (1 µg/mL; InvivoGen, San 104 Diego, CA) e TLR-9 - CpG ODN1826 (1 µg/mL, InvivoGen) e LPS de *Escherichia coli* - agonista de TLR-4 (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que foi utilizado como controle positivo. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. O sobrenadante da cultura foi coletado 24 horas após estimulação para dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12p40.

3.6. Extração e cultivo de células da medula óssea

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos IRAK-4^{-/-}, IRAK-4^{+/-}, MyD88^{-/-} e C57BL/6 foram sacrificados e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. A

extremidade proximal e distal destes ossos foi seccionada e foi injetado 5 mL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco, Carlsbad, CA) por osso.

A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1200 RPM por 10 minutos, a 4°C, e o precipitado foi ressuscitado em 10 mL/por animal de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT) e submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 µm (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 as células não diferenciadas. Para isso, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos, a 4°C, e ressuscitadas em 2 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o Azul de Trypan 0,02% como corante para visualização das células vivas.

3.6.1. Diferenciação das células extraídas da medula em Células Dendríticas (BMDC) para determinação da produção de citocinas pró-inflamatórias

As células extraídas da medula foram diferenciadas em células dendríticas plaqueando-as em placas de Petri na concentração de 1×10^7 células/placa. As células foram mantidas em 7 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT), 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina (1 µg/mL, Gibco, Carlsbad, CA) e 30% de GM-CSF (fator estimulante de macrófago e granulócitos). As placas então foram incubadas a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂.

No terceiro dia após o início da cultura foram adicionados 5 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de

soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT), 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina (1 µg/mL, Gibco, Carlsbad, CA) e 30% de GM-CSF. No quinto dia, foram retirados 4 mL da cultura e adicionados 5 mL de DMEM suplementado como descrito acima.

No décimo dia de cultura as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos, a 4°C, e ressuspensas em 1 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o Azul de Trypan 0,02% como corante para visualização das células vivas.

As células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC) na concentração de 3×10^5 células/poço em um volume final de 150 µL. Posteriormente, as células foram estimuladas com *B. abortus* S2308 (MOI $10^3:1$), HKBa (MOI $10^3:1$), agonistas de TLR-2 – Pam3CSK4 (1 µg/mL; InvivoGen, San 104 Diego, CA) e TLR-9 - CpG ODN1826 (1 µg/mL, InvivoGen) e LPS de *Escherichia coli* - agonista de TLR-4 (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que foi utilizado como controle positivo. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. O sobrenadante da cultura foi coletado 24 horas após estimulação para dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12p40.

3.6.2. Diferenciação das células da medula em Macrófagos (BMM ϕ)

As células extraídas da medula foram diferenciadas em macrófagos plaqueando-as em placas de 24 poços (5×10^5 cel/poço/mL) para determinação da produção de citocinas e em placas de 6 poços (2×10^6 cel/poço/2 mL) para as análises por *Western Blotting*. As células foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT), 1% de HEPES 1 M (Gibco, Carlsbad, CA) e 10% de LCCM (L929 *cell*

conditioned medium), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos). As placas então foram incubadas a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂.

Quatro dias após o plaqueamento das células, foram adicionados 10% 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 estão completamente diferenciadas em macrófagos (Gomes & Appelberg, 2002).

3.6.2.1. Cultura de BMMφ para determinação da produção de citocinas pró-inflamatórias

Os BMMO de camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} foram estimulados, no décimo dia de cultura, com *B. abortus* S2308 (MOI 10³:1), HKBa (MOI 10³:1), agonistas de TLR-2 – Pam3CSK4 (1 µg/mL; InvivoGen, San 104 Diego, CA) e TLR-9 - CpG ODN1826 (1 µg/mL, InvivoGen) e LPS de *Escherichia coli* - agonista de TLR-4 (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que foi utilizado como controle positivo. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado utilizando pipeta *Pasteur* com o auxílio de uma bomba de vácuo e, em seguida, foram adicionados 500 µL de cada estímulo/poço. O sobrenadante da cultura foi coletado 24 horas após estimulação para dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-12p40.

3.6.2.2. Cultura de BMMφ para análise da sinalização intracelular por *Western Blotting*

No décimo dia de cultura, o meio dos BMMO de camundongos IRAK-4^{-/-}, IRAK-4^{+/-}, MyD88^{-/-} e C57BL/6 foi retirado e as células foram cadenciadas por meio da adição DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Carlsbad, CA) e incubação por 16h a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram estimuladas com *B. abortus* S2308 (MOI 10³:1) e LPS de *Escherichia coli* - agonista de

TLR-4 (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 10, 30 e 60 minutos. Após cada tempo de incubação o sobrenadante da cultura foi retirado e as células foram utilizadas para obtenção de extrato protéico. O extrato protéico foi obtido utilizando-se 100 µL do tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM β-glicerofosfato, 0,1 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 mM ortovanadato de sódio) suplementado com mix de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O lisado celular foi centrifugado a 8000 RPM por 1 minuto e posteriormente quantificado utilizando-se o reagente para dosagem de proteína da Bio-Rad (método de Bradford modificado para microplacas) de acordo com as recomendações do fabricante (Bio-Rad laboratories, Inc.). Vinte microgramas do extrato protéico foram aplicados com tampão de amostra (1% SDS, 5% de β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 1 mM EDTA e 0,05% de azul de bromofenol) em gel de SDS-PAGE de 12% e submetidos a eletroforese a 100 V. As proteínas fracionadas pelo SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em uma voltagem de 100 V por 1 a 2 horas em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% v/v metanol). Após a transferência, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio (PBS contendo 5% de albumina bovina) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi então incubada *overnight* à 4°C sob agitação, com os anticorpos primários diluídos em tampão de anticorpo (PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 1% de albumina bovina). Os anticorpos utilizados foram o anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182), anti-phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1), anti-β-actin (13E5), (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA). As membranas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,1% e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase. As bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando-se Luminol

(Millipore) e analisadas em Storm System 860 (Amersham Biosciences). As análises de densitometria foram realizadas utilizando o Software KODAC version 1D-3.5.

3.7. Dosagem das citocinas por ELISA

Foram determinadas as concentrações de TNF- α da cultura de esplenócitos (48 horas após estimulação) e IFN- γ (72 horas após a estimulação). Dos sobrenadantes das culturas de macrófagos e das células dendríticas derivadas da medula óssea foram dosados TNF- α e IL-12p40. Todos os sobrenadantes foram coletados após 24 horas de estimulação. A partir do soro dos animais infectados foi determinada a concentração de IL-12p40. As dosagens foram baseadas no método de ELISA sanduíche, utilizando os kits fornecidos pela R&D System de acordo com o protocolo do fabricante. A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro, a uma leitura de 450 nm e os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc).

3.8. Dosagem de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi dosada a partir da cultura de esplenócitos (48 horas após estimulação). A dosagem da concentração do NO foi feita a partir do método colorimétrico de Greiss. Resumidamente, 50 μ L dos sobrenadantes das culturas de células e da curva padrão contendo NaNO₂ (pico da curva: 200 μ M) foram colocados em placas de 96 poços. Em seguida, foi adicionado igual volume do reagente de Greiss. Este reagente é uma solução composta de N-(1-Naphthyl) ethyl-ene Diamine a 0,1%, e sulfanilamida a 1%, sendo que estes dois reagentes são preparados com ácido fosfórico a 2,5%. A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro, a uma leitura de 490 nm e os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc).

3.9. Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados por meio do teste *t* de Student, utilizando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc). O nível de significância adotado nas análises foi $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Tipagem dos camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}

Camundongos deficientes para a molécula IRAK-4 (IRAK-4^{-/-}) foram gerados por meio da inserção do cassete de neomicina no éxon 2 do gene codificador da proteína IRAK-4 (Suzuki *et al.* 2002a). Camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} foram doados ao nosso laboratório e a colônia foi mantida no Biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (ICB/UFMG).

Para confirmação do genótipo de inserção do gene de neomicina no gene IRAK-4 foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores que amplificam o gene selvagem (Iniciadores A e C) e iniciadores que amplificam o gene interrompido (Iniciadores B e C). Dessa maneira, animais que apresentaram bandas eletroforéticas correspondentes aos produtos de amplificação das reações utilizando-se apenas os iniciadores B e C, possuíam as duas cópias do gene interrompido (IRAK-4^{-/-}). Já os animais em que foi observada amplificação tanto na reação utilizando-se os iniciadores A e C quanto na reação utilizando-se os iniciadores B e C, possuíam uma cópia do gene selvagem e uma cópia do gene interrompido (IRAK-4^{+/-}). Como controle da amplificação do gene selvagem foi utilizado DNA de camundongo C57BL/6. (Figura 8).

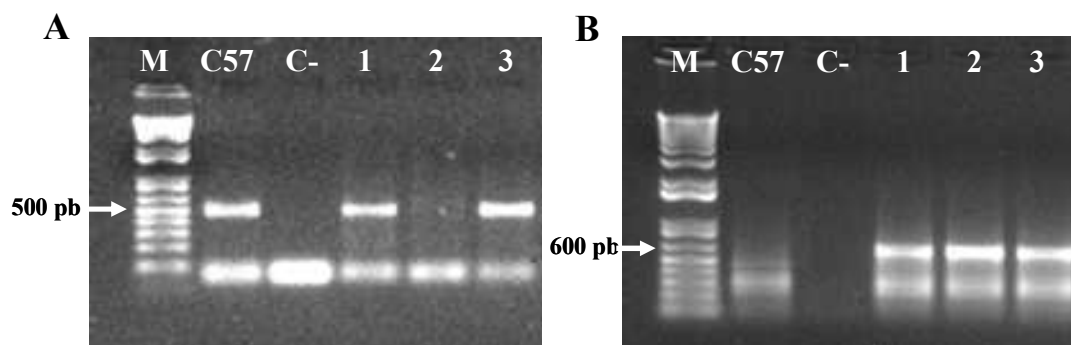


Figura 8: Tipagem dos animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As canaletas representadas pelos números 1, 2 e 3 representam o produto de amplificação de 3 animais analisados. (A) Produtos de amplificação utilizando-se os iniciadores A e C que amplificam o gene selvagem. (B) Produtos de amplificação utilizando-se os iniciadores B e C que amplificam o gene interrompido. O DNA de um camundongo C57BL/6 foi utilizado como controle de amplificação do gene selvagem. M: marcador de peso molecular DNA ladder 1 Kb. C-: Controle negativo.

O gel demonstra o produto da amplificação de três animais analisados. Em (A) têm-se o resultado da amplificação utilizando-se os iniciadores A e C que amplificam o gene selvagem. Apenas o animal indicado pelo número 2 não possuía uma cópia selvagem do gene. Em (B) têm-se o resultado da amplificação utilizando-se os iniciadores que amplificam o gene interrompido. Dessa maneira, os animais 1 e 3, como possuíam tanto uma cópia do gene selvagem quanto uma cópia do gene interrompido, foram considerados heterozigotos para o gene codificador da molécula IRAK-4 (IRAK-4^{+/-}), já o animal 2 possuía apenas o gene interrompido e assim, foi considerado *knockout* (IRAK-4^{-/-}).

4.2. Os camundongos IRAK-4^{-/-} são mais susceptíveis à bactéria *B. abortus* apenas no início da infecção

Para avaliar a contribuição da molécula IRAK-4 na infecção murina por *B. abortus*, camundongos deficientes e heterozigotos para esta molécula foram infectados com 1×10^6 UFC da cepa S2308 e o número de bactérias no baço foi monitorado por meio da contagem de UFC.

Os camundongos IRAK-4^{-/-} foram mais susceptíveis à *B. abortus* apenas na primeira semana após a infecção (Figura 9). Neste período, a contagem de UFC do baço dos animais IRAK-4^{-/-} foi 1,22 log superior em relação aos animais heterozigotos (IRAK-4^{+/-}). A partir da terceira semana após a infecção os camundongos IRAK-4^{-/-} apresentaram a contagem do número de bactérias no baço semelhante aos camundongos IRAK-4^{+/-}, indicando um papel proeminente de IRAK-4 apenas na fase inicial do curso da infecção pela *B. abortus*.

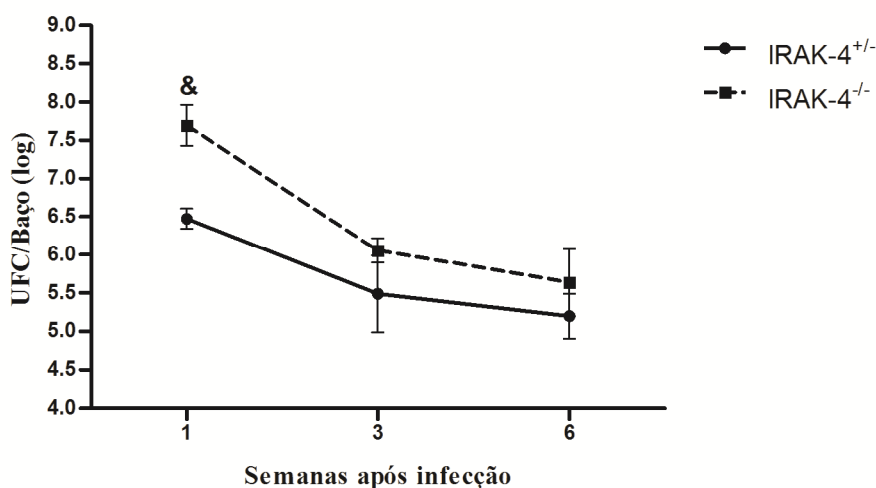


Figura 9: Cinética de infecção em camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-}. Os camundongos foram infectados com *B. abortus* e o número de bactérias no baço foi analisado por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) 1, 3 e 6 semanas após a infecção. (&) Diferença significativa em relação ao animal heterozigoto (IRAK-4^{+/-}) para $p < 0,05$.

4.3. A deficiência em IRAK-4 resulta em uma menor ativação da resposta imunológica de perfil Th1

A indução de uma resposta imunológica de perfil Th1 é vista como crucial para um eficiente controle da infecção pela *Brucella abortus* (Ugalde *et al.*, 2003, Bessoles *et al.*, 2009). Neste sentido, orquestrando essa resposta têm-se a participação da citocina IL-12 que estimula linfócitos T CD4⁺ e células NK a secretarem IFN- γ . O IFN- γ produzido por estas células ativa o macrófago induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e TNF- α culminando com a destruição da bactéria (Golding *et al.*, 2001).

No intuito de avaliar a ativação da resposta inflamatória Th1 nos animais deficientes em IRAK-4, a produção das citocinas inerentes a esse perfil imunológico foi avaliado.

Primeiramente, para avaliar a produção de IL-12 *in vivo*, animais IRAK-4^{+/-} e animais IRAK-4^{-/-} foram infectados intraperitonealmente com a *B.abortus* S2308 e 3, 7, 10 e 14 dias após infecção foi coletado sangue pelo plexo retro-orbital dos animais. Após a coleta, o soro foi utilizado para determinação da concentração de IL-12.

A produção de IL-12 nos animais IRAK-4^{-/-} foi inferior a produção nos camundongos IRAK-4^{+/-} em todos os tempos avaliados. Além disso, foi observado que camundongos heterozigotos apresentaram o pico sérico de produção da IL-12 no 10º dia após a infecção (Figura 10).

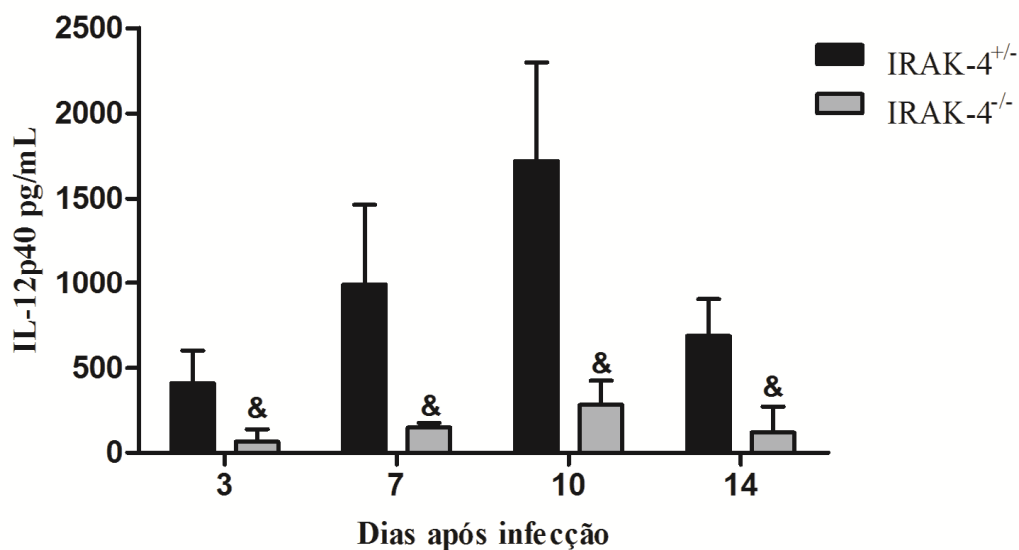


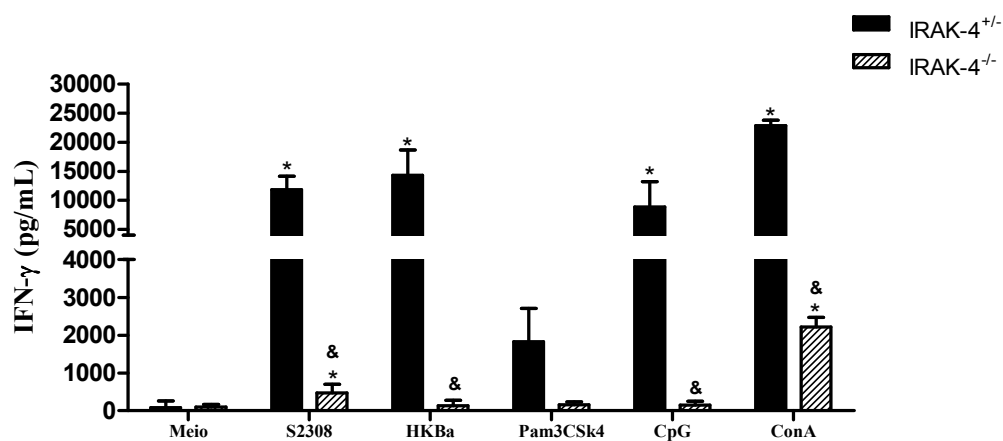
Figura 10: Cinética da produção de IL-12p40 no soro de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} infectados com *B.abortus*. Os camundongos foram infectados com *B.abortus* S2308 e 3, 7, 10 e 14 dias após infecção o soro foi obtido para avaliação da produção de IL-12p40. (*) Significativo em relação ao animal heterozigoto (IRAK-4^{+/-}).

Dessa maneira, tendo em vista a deficiência na produção de IL-12 pelos animais IRAK-4^{-/-}, a produção de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico foram avaliados nas células esplênicas de animais IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} infectados. O baço de ambas as linhagens foram retirados e as células preparadas e plaqueadas como descrito na seção 3.4.3.1. Os esplenócitos foram estimulados com *B. abortus*, HKBa e agonistas dos receptores TLR2 e TLR9, Pam3CSK4 e CpG, respectivamente. Além disso, as células foram estimuladas com LPS (agonista de TLR4) como controle positivo da produção de citocinas.

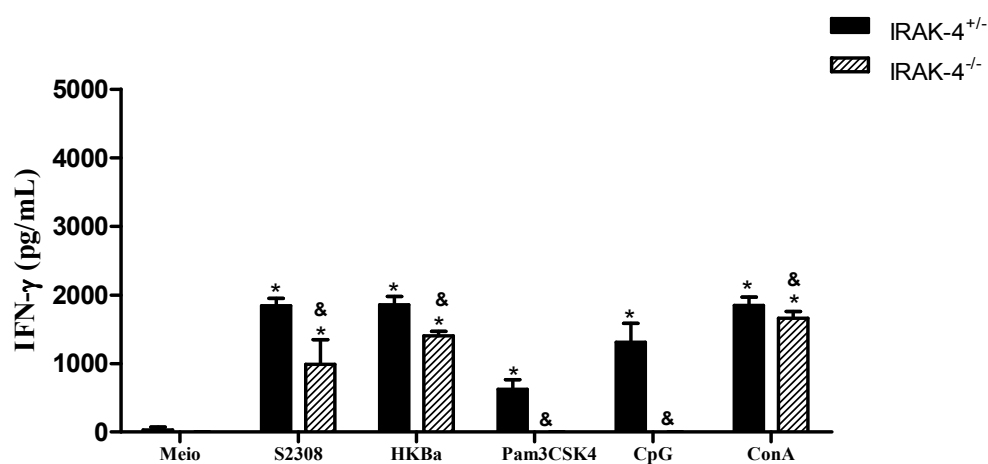
Após 72 horas de cultura, o sobrenadante foi coletado para avaliação da produção de IFN- γ . Houve uma menor produção de IFN- γ pelos camundongos deficientes em IRAK-4 em relação aos camundongos heterozigotos na 1^a e 3^a semanas após a infecção quando os esplenócitos foram estimulados com *B. abortus* S2308 e com HKBa. Além disso, a produção de IFN- γ foi abolida nos esplenócitos estimulados com Pam3CSK4 e CpG, agonistas de TLR2 e TLR9, respectivamente.

Vale ressaltar que a produção de IFN- γ pelos camundongos IRAK-4^{+/-} é mais proeminente na 1ª semana após infecção. A partir da 3ª semana estes animais apresentam uma redução na produção desta citocina. Já para os camundongos IRAK-4^{-/-} a produção de IFN- γ se apresenta significativamente reduzida em relação aos camundongos heterozigotos, na 1ª e 3ª semanas após infecção. É importante observar, entretanto que a diferença na produção de IFN- γ entre duas linhagens de camundongos foi exarcebada na 1ª semana após infecção. A partir da 6ª semana após infecção, não foi observada diferença significativa na produção desta citocina entre os animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} (Figura 11).

A



B



C

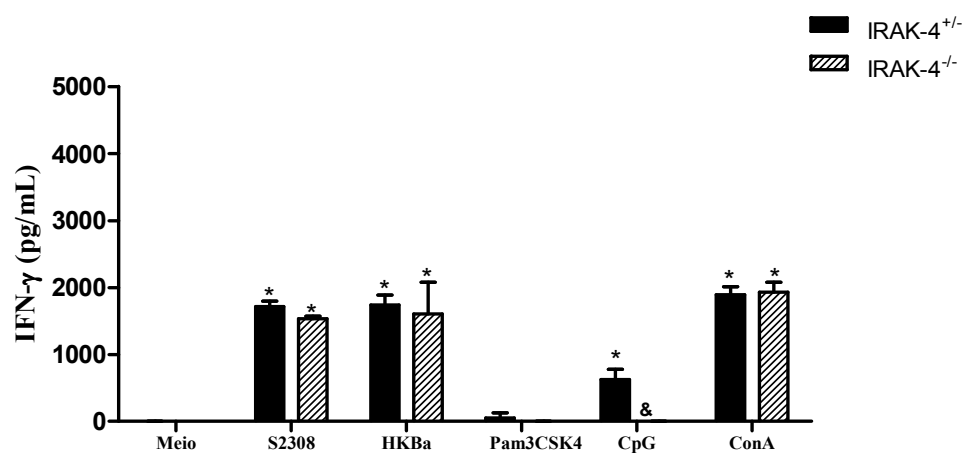


Figura 11: Produção de IFN- γ pelas células do baço de camundongos IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} infectados com *B. abortus*. (A) 1 Semana após a infecção (s.p.i.), (B) 3 s.p.i. e (C) 6 s.p.i. Os esplenócitos foram estimulados com *B. abortus*, HKBa e agonistas de TLRs por 72 h (*) Significativo em relação ao meio. (&) Significativo em relação ao animal IRAK-4^{+/-}.

O sobrenadante da cultura também foi coletado para dosagem de TNF- α e óxido nítrico (NO) após 48 horas de estimulação. Em relação à citocina TNF- α , foi observado que os camundongos IRAK-4^{-/-} demonstraram uma menor produção desta citocina, quando comparada com os animais heterozigotos, em todas as semanas analisadas (Figura 12). Esta produção foi inferior quando foi utilizado como estímulo tanto a bactéria viva (S2308) quanto à bactéria inativada pelo calor (HKBa) . Já quando avaliada a produção de NO, também foi possível observar uma redução significativa na produção deste composto nos animais IRAK-4^{-/-} para o estímulo HKBa, na 1^a e 3^a s.p.i. (Figura 13).

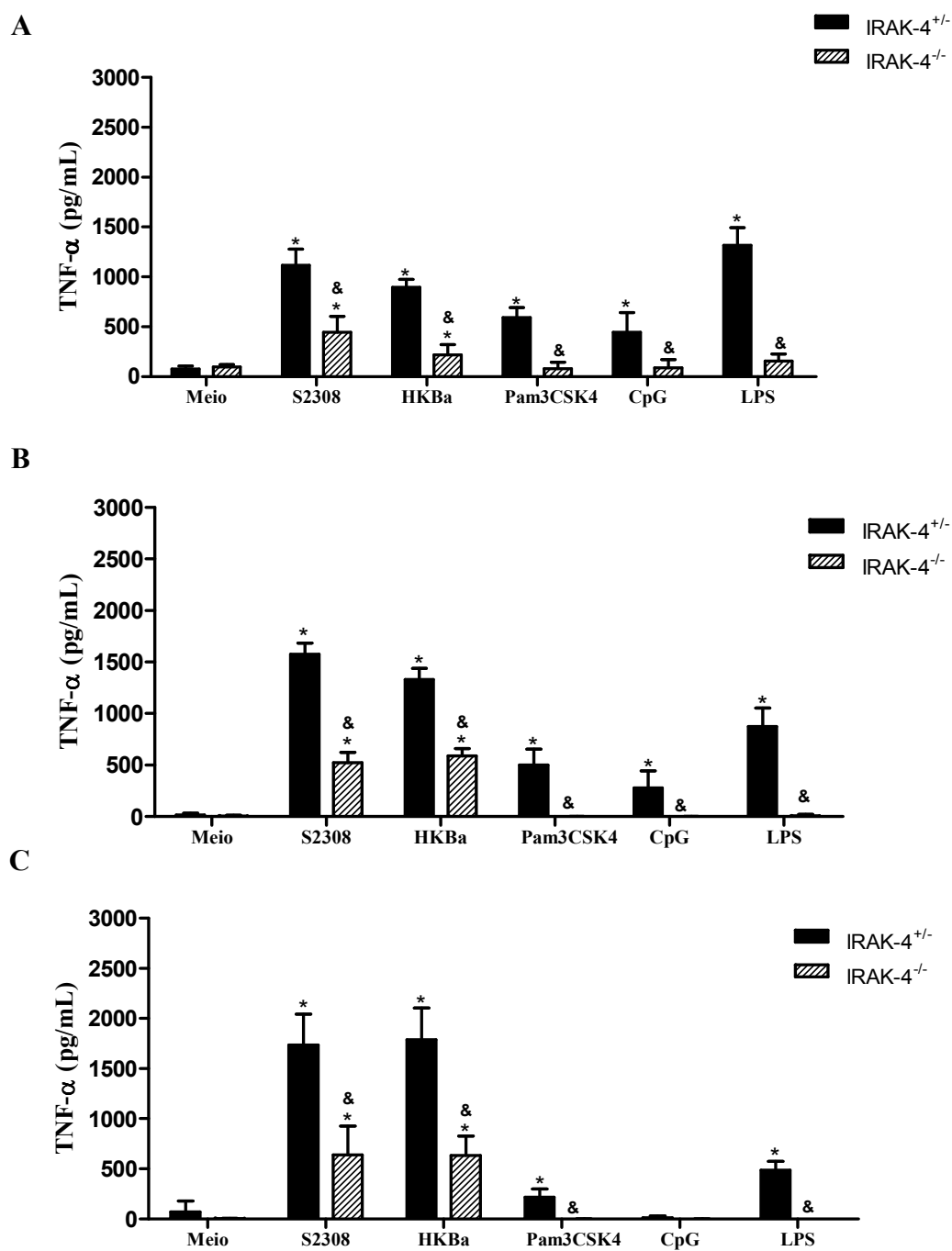


Figura 12: Produção de TNF- α pelas células do baço de camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} infectados com *B. abortus*. (A) 1 Semana após infecção (s.p.i) (B) 3 s.p.i. e (C) 6 s.p.i. Os esplenócitos foram estimulados com a *B. abortus*, HKBa e agonistas de TLRs por 48 h. (*) Significativo em relação ao meio. (&) Significativo em relação ao animal IRAK-4^{+/-}.

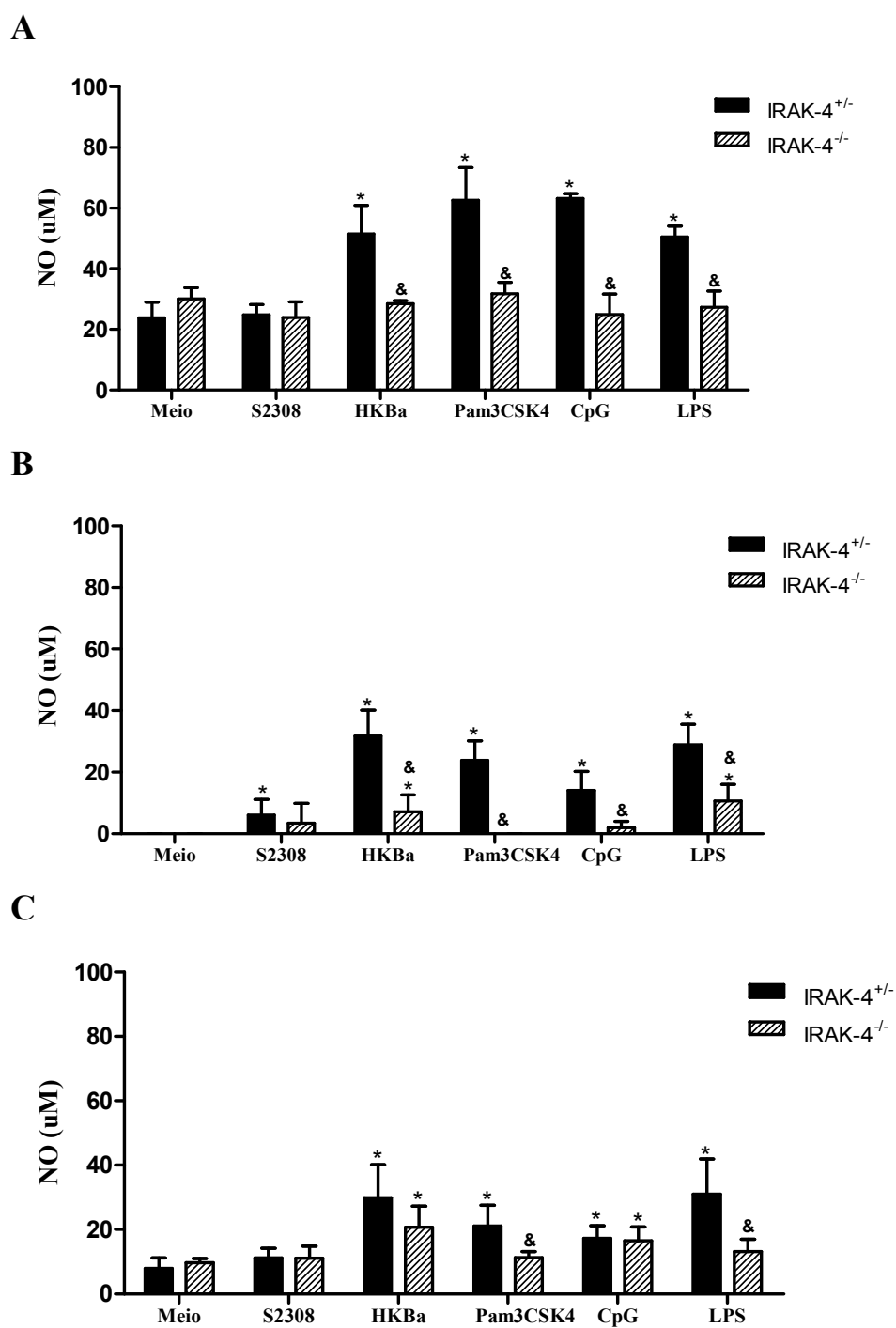


Figura 13: Produção de óxido nítrico pelas células do baço de camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} infectados com *B. abortus*. (A) 1 Semana após a infecção (s.p.i.), (B) 3 s.p.i e (C) 6 s.p.i. Os esplenócitos foram estimulados com *B. abortus*, HKBa e agonistas de TLRs por 48 h. (*) Significativo em relação ao meio. (&) Significativo em relação ao animal IRAK-4^{+/-}.

4.4. A deficiência em IRAK-4 resulta em uma menor produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e por células NK1.1⁺/CD3⁻ de animais infectados com *B. abortus*

Com o intuito de averiguar qual tipo o celular que está envolvido na produção de IFN- γ pelos animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-}, foram feitas análises de citometria de fluxo para avaliar dentro de cada população celular (CD4⁺, CD8⁺ e NK1.1⁺/CD3⁻) o percentual total dessas células responsáveis pela produção de IFN- γ . Primeiramente, a zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) característicos dessas células (Figura 14). A partir dessa seleção foram criados Dotplots para cada população das células T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK1.1⁺/CD3⁻ (Figura 15A). Dentro de cada população celular (Figura 15A) foi obtido um histograma revelando a porcentagem de células dentro daquela população que era produtora de IFN- γ (Figura 15B).

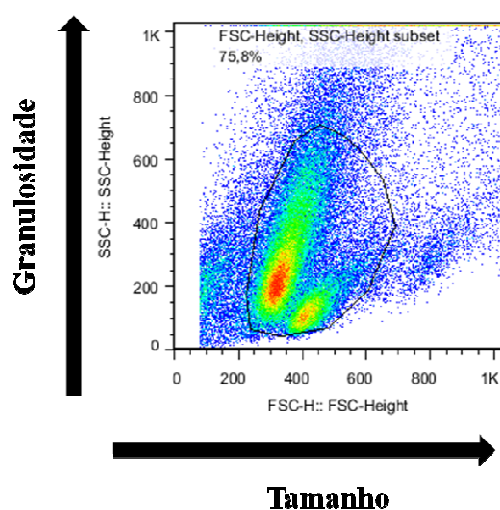


Figura 14: Dotplot demonstrando a seleção das células analisadas de acordo com tamanho e granulosidade.

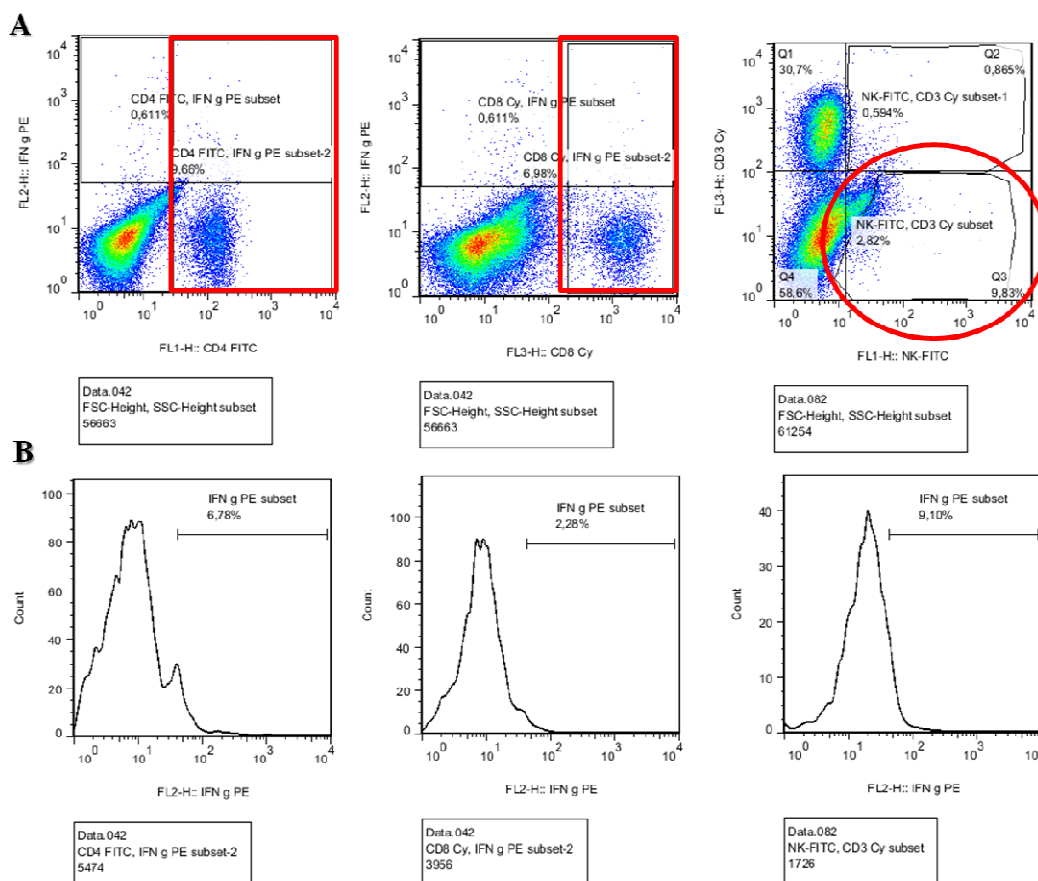


Figura 15: Avaliação dos tipos celulares produtores de IFN- γ no baço de animais infectados com *B. abortus*. Em (A) Dot plot demonstrando o quadrante das células CD4⁺, CD8⁺ e NK1.1⁺CD3⁻, nesta ordem. Em (B) Histograma demonstrando a porcentagem de células produtoras de IFN- γ dentro de cada população.

Os dados obtidos a partir da análise, representados na Tabela 1, demonstram que a produção de IFN- γ é inferior nos linfócitos T CD4⁺ dos animais deficientes em IRAK-4 na 1^a s.p.i., quando estes foram estimulados com a bactéria inativada pelo calor (HKBa). Além disso, a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ e pelas células NK1.1⁺CD3⁻ também foi inferior nos camundongos IRAK-4^{-/-}, comparado aos camundongos heterozigotos, na 1^a s.p.i. quando o estímulo utilizado foi HKBa. A partir da 3^a s.p.i. não foi observada diferença na produção de IFN- γ pelos tipos celulares avaliados entre os animais deficientes em IRAK-4 e os animais heterozigotos.

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

s.p.i. ^a		Meio	HKBa ^b	ConA
1 ^a	CD4⁺			
	IRAK-4 ^{+/-}	3,49±1,12	17,55±4,56*	27,98±3,78*
	IRAK-4 ^{-/-}	3,16±0,62	4,58±1,11*,&	14,92±2,17*,&
	CD8⁺			
	IRAK-4 ^{+/-}	1,91±0,33	10,23±4,25*	16,50±4,67*
	IRAK-4 ^{-/-}	0,94±0,25&	1,59±0,43*,&	8,11±2,53*,&
	NK1.1⁺/CD3⁻			
	IRAK-4 ^{+/-}	5,61±3,32	24,33±5,28*	30,65±12,33*
	IRAK-4 ^{-/-}	6,53±1,70	8,78±3,61&	11,88±3,34*,&
3 ^a	CD4⁺			
	IRAK-4 ^{+/-}	2,68±0,60	7,19±2,39*	9,43±3,05*
	IRAK-4 ^{-/-}	2,67±1,04	6,21±0,75*	8,37±1,73*
	CD8⁺			
	IRAK-4 ^{+/-}	0,58±0,06	3,34±0,94*	3,91±1,12*
	IRAK-4 ^{-/-}	1,26±0,58	2,79±0,76*	7,96±1,78*,&
	NK1.1⁺/CD3⁻			
	IRAK-4 ^{+/-}	4,44±1,79	13,29±4,65*	10,39±3,76*
	IRAK-4 ^{-/-}	6,16±1,37	15,90±4,17*	10,71±2,77*

s.p.i. ^a (Semanas após a infecção)

HKBa^b (*Brucella* inativada pelo calor)

4.5. IRAK-4 é importante para a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da sinalização intracelular

O reconhecimento da *Brucella* por células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação dessas células e concomitante produção de citocinas pró-inflamatórias.

Com o intuito de avaliar o papel de IRAK-4 na produção das citocinas TNF- α e IL-12, macrófagos e células dendríticas foram estimulados com a *B. abortus* viva e inativada pelo calor (HKBa) e com agonistas do TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS *E. coli*) e TLR9 (CpG). Após 24 horas de estimulação o sobrenadante foi coletado para determinação da concentração dessas citocinas. Também foi avaliado, por *Western Blotting*, o perfil de ativação da via das MAP cinases por meio da fosforilação de p38 e ERK1/2, bem como a ativação de NF- κ B por meio da observação da fosforilação da subunidade p65.

4.5.1. A produção de citocinas pelas Células Dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) é dependente de IRAK-4

A produção das citocinas pelas BMDC demonstrou ser dependente de IRAK-4 tendo em vista que os níveis de IL-12 e TNF- α não foram detectados nos sobrenadantes destas células provenientes dos camundongos deficientes em IRAK-4, quando estes foram estimulados com *B. abortus* e HKBa. (Figura 16). Além disso, a produção de citocinas induzidas por agonistas de TLR2 e TLR9 foi dependente de IRAK-4. No entanto, houve uma pequena produção tanto de IL-12 quanto TNF- α quando as BMDC deficientes em IRAK-4 foram estimuladas com LPS (agonista de TLR4).

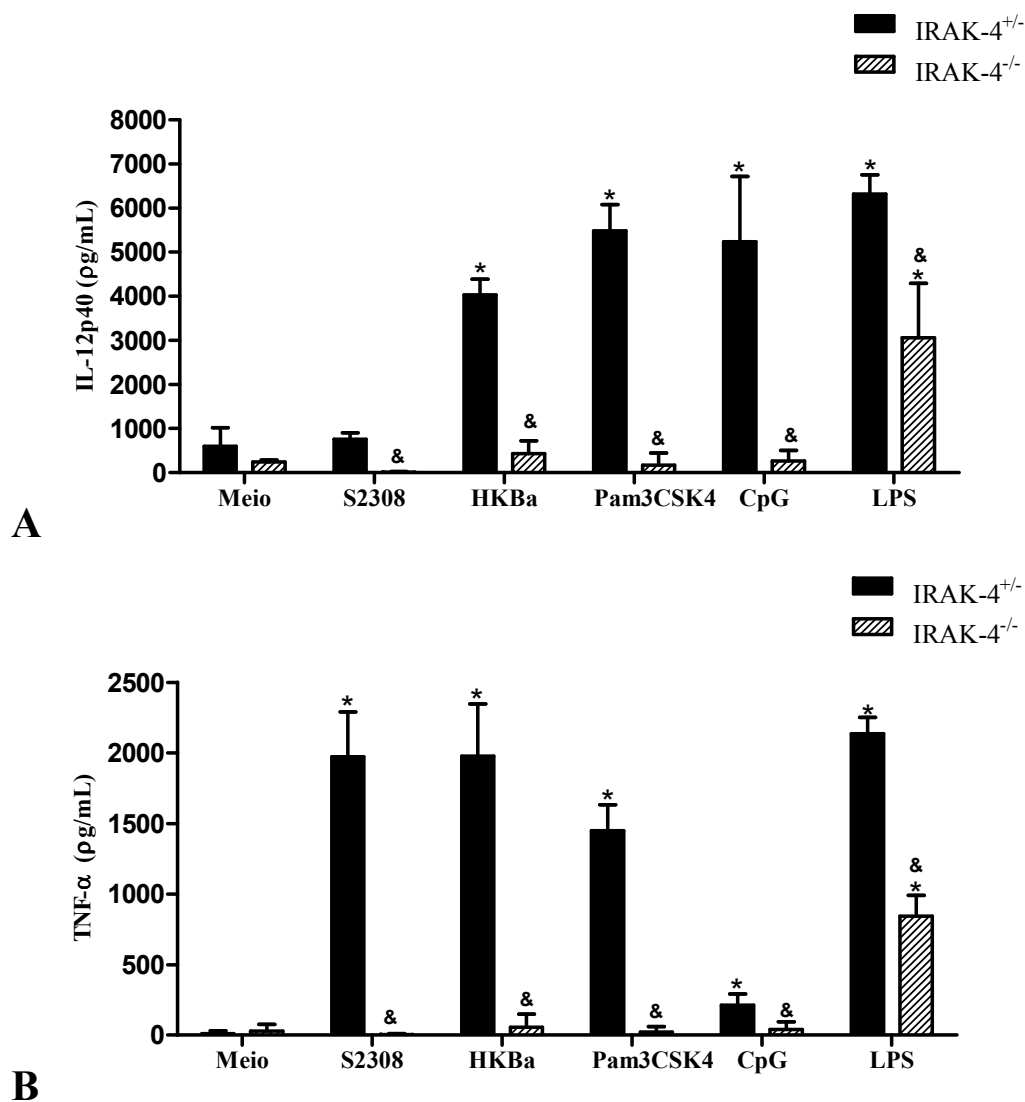


Figura 16: Produção de IL-12p40 (A) e TNF- α (B) por células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/+}. As BMDCs foram cultivadas e estimuladas com *B. abortus*, HKBa e com agonistas dos TLRs. A concentração de citocinas foi determinada por ELISA após 24h. (*) Significativo em relação ao meio; (&) Significativo em relação ao animal heterozigoto (IRAK-4^{+/+}).

4.5.2. A produção de citocinas pelos macrófagos inflamatórios é dependente de IRAK-4

A produção de citocinas pró-inflamatórias também foi analisada em macrófagos inflamatórios peritoneais. Esses macrófagos são recrutados para a região peritoneal por meio da inoculação do meio Tioglicolato.

Os macrófagos inflamatórios deficientes na molécula IRAK-4 demonstraram uma deficiência na produção das citocinas analisadas IL-12p40 e TNF- α . (Figura 17). A bactéria *B. abortus*, viva e inativada pelo calor, foram capazes de induzir a produção tanto de IL-12 quanto de TNF- α nos camundongos IRAK-4^{+/+}. Diferentemente, o mesmo não foi observado nos camundongos IRAK-4^{-/-}, em que a produção de ambas as citocinas foram bastante reduzidas quando os macrófagos foram estimulados com a *B. abortus* e com agonistas de TLR.

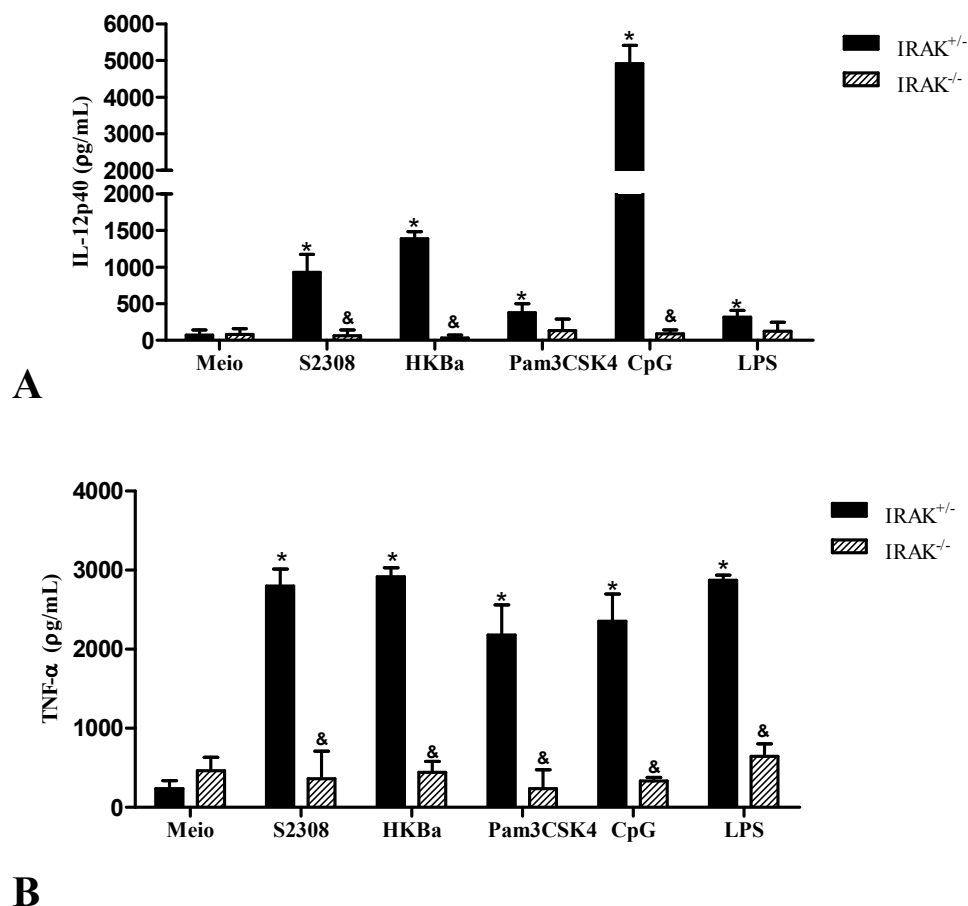


Figura 17: Produção de IL-12p40 (A) e TNF- α (B) por macrófagos inflamatórios derivados de camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-}. Os M ϕ foram cultivados e estimulados com *B. abortus*, HKBa e com agonistas dos TLRs. A concentração de citocinas foi determinada por ELISA após 24h. (*) Significativo em relação ao meio; (&) Significativo em relação ao animal heterozigoto (IRAK-4^{+/-}).

4.5.3. IRAK-4 é essencial para a produção de citocinas pelos macrófagos derivados de medula óssea (BMMO)

A produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos derivados de medula óssea também foi avaliada. Foi observada uma grave deficiência na produção das citocinas IL-12 e TNF- α nos macrófagos deficientes para a molécula IRAK-4 (Figura 18).

Os BMMO provenientes dos camundongos IRAK-4^{-/-} demonstraram um bloqueio da produção de IL-12 e TNF- α não somente quando foram estimulados com a bactéria viva e inativada pelo calor, mas também quando estimuladas por agonistas dos receptores TLR2 e TLR9. No entanto, houve uma pequena, mas significativa produção de TNF- α nas células deficientes em IRAK-4, quando estas foram estimuladas com LPS (agonista de TLR4).

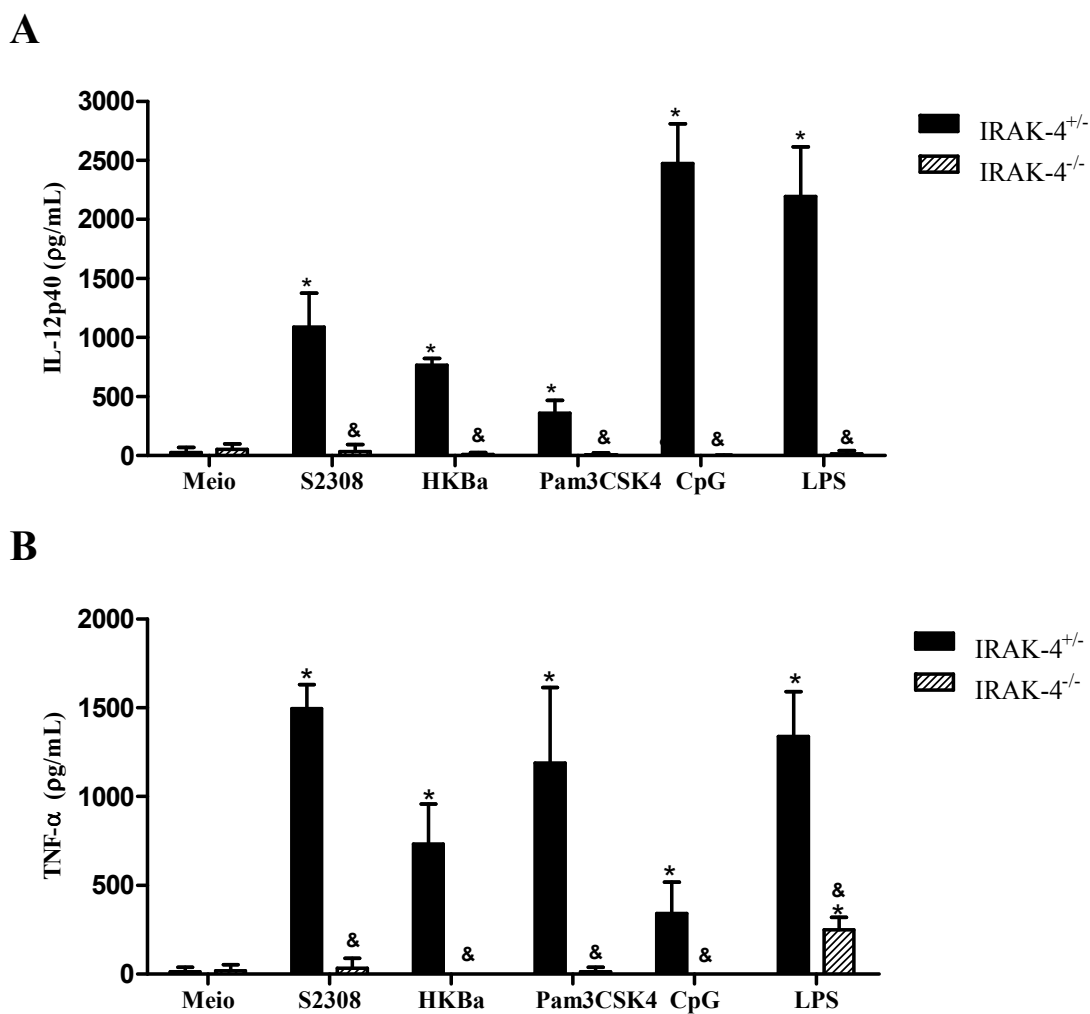


Figura 18: Produção de IL-12p40 (A) e TNF- α (B) por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-}. Os macrófagos foram cultivados e estimulados com *B. abortus*, HKBa e com agonistas dos TLRs. A concentração de citocinas foi determinada por ELISA após 24h. (*) Significativo em relação ao meio; (&) Significativo em relação ao animal heterozigoto (IRAK-4^{+/-}).

4.5.4. IRAK-4 é uma importante molécula nas vias de sinalização por MAP cinases e NF-κB induzidas por *Brucella abortus*

Para investigar a participação de IRAK-4 nas vias de sinalização por MAP cinases e NF-κB, vias importantes na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, BMMO provenientes de animais IRAK-4^{+/-} e IRAK-4^{-/-} foram estimulados com a *B. abortus* S2308 e LPS de *E. coli* por 10, 30 e 60 minutos. Foi realizada também uma avaliação da participação de MyD88 na ativação dessas vias, utilizando-se camundongos deficientes para esta molécula (MyD88^{-/-}). Após a estimulação, foi avaliado o perfil de fosforilação das proteínas envolvidas na sinalização MAP cinases, ERK1/2 e p38, e também foi avaliada a fosforilação de p65, uma subunidade de NF-κB, cuja fosforilação indica a ativação de NF-κB.

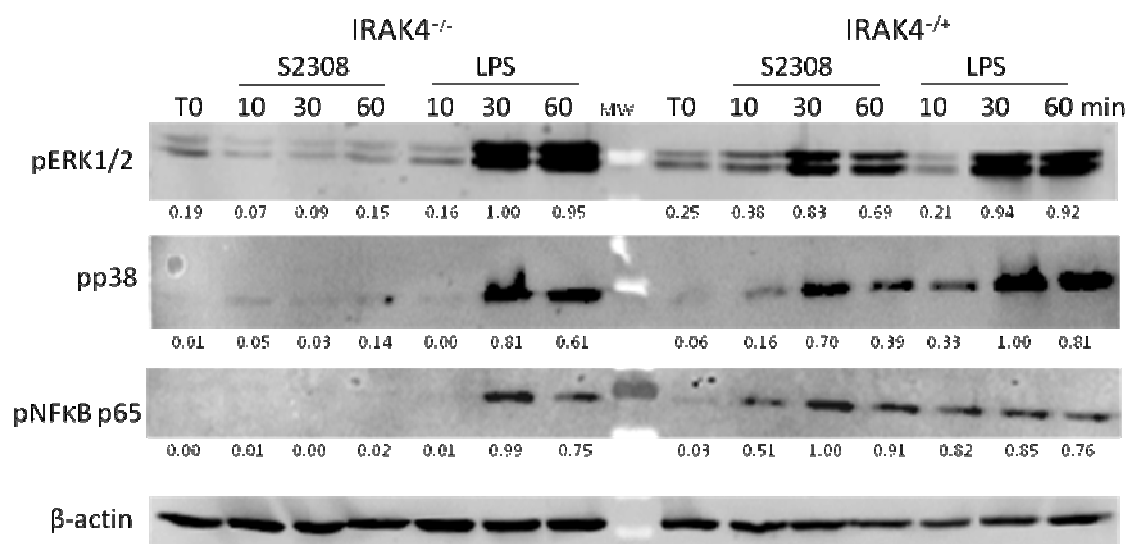
Conforme mostrado na Figura 19, *B. abortus* é um indutor da fosforilação de ERK1/2 e p38 como observado nos animais IRAK-4^{+/-} (Figura 19A, Painel à direita) e C57BL/6 (Figura 19A, Painel à direita). Além disso, foi possível observar a fosforilação de p65 nestes animais, indicando a ativação de NF-κB induzida por *B. abortus*.

A fosforilação das MAP cinases, ERK1/2 e p38, e da subunidade p65, induzida por *B. abortus*, foi dependente de IRAK-4, uma vez que nos animais IRAK-4^{-/-} não houve fosforilação dessas proteínas. No entanto, a estimulação dos BMMO deficientes em IRAK-4 com LPS foi capaz de induzir a ativação tardia, após 30 minutos, das MAP cinases e de NF-κB. Dessa forma, a ativação dessas vias parece ser independente de IRAK-4 quando o receptor TLR4 é ativado pelo LPS (Figura 19A, Painel à esquerda).

Resultados semelhantes foram observados nos macrófagos provenientes de animais deficientes em MyD88^{-/-}. Não foi observada a fosforilação das MAP cinases avaliadas neste trabalho e da subunidade p65, quando os macrófagos foram estimulados por *B. abortus*. Já a ativação quando os BMMO foram estimulados com LPS foi observada a

partir dos 30 minutos. Dessa maneira, a fosforilação de ERK1/2, p38 e p65 induzida por *B. abortus* é dependente de MyD88, enquanto que essa ativação induzida por LPS, aos 30 e 60 minutos após a estimulação mostrou-se independente de MyD88 (Figura 19B, Painel à esquerda).

A



B

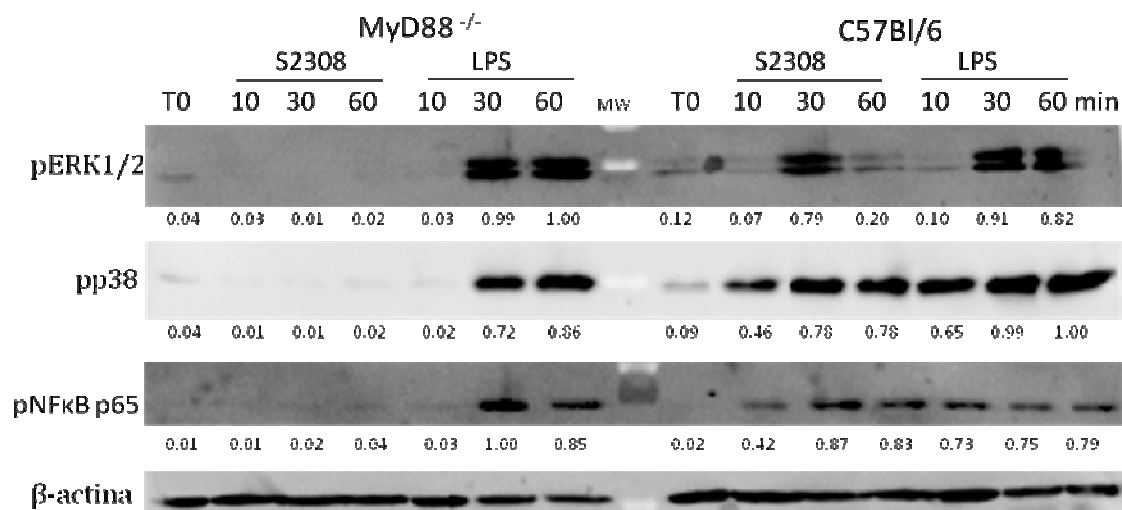


Figura 19: Avaliação da sinalização intracelular em BMMφ. Macrófagos derivados de medula óssea provenientes de animais IRAK-4^{-/-} e IRAK-4^{+/-} (A), Myd88^{-/-} e C57BL/6 (B) foram estimulados com S2308 e LPS. Após 10, 30 e 60 minutos de estimulação o extrato protéico foi preparado e foram avaliadas a fosforilação de ERK1/2 e p38, bem como a fosforilação de p65.

5. Discussão

O sistema imune inato do hospedeiro utiliza de uma variedade de receptores que reconhecem conservadas estruturas microbianas, como por exemplo, o peptidoglicano e o lipopolissacarídeo (LPS) (Armant & Fenton, 2002). Os receptores do tipo Toll (TLRs), um desses tipos de receptores, reconhecem padrões moleculares associados à patógenos e ativam o sistema imune inato do hospedeiro, induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e o TNF- α , o que, por sua vez levam ao desencadeamento de uma resposta imune adaptativa (Vasselon & Detmers, 2002).

O envolvimento dos TLRs na resposta imune contra a *Brucella* já foi demonstrado por vários autores (Campos *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003, Weiss *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2008). Os receptores TLR2 e TLR4 estão envolvidos no reconhecimento da *Brucella* por macrófagos e células dendríticas, e a produção de TNF- α e IL-12, por essas células, é dependente da ativação desses receptores. No entanto, TLR2 e TLR4 possuem pouco ou nenhum papel no controle da infecção por esta bactéria (Campos *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003, Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Já em relação ao TLR9, foi observada a dependência deste receptor pelas células dendríticas estimuladas com HKBa para produção de IL-12, bem como foi observada maior participação do TLR9 no controle da infecção pela *B. abortus*. (Huang *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2008). Ademais, o DNA da *B. abortus* foi capaz de ativar a produção de citocinas em células dendríticas de maneira dependente do TLR9, colocando esta molécula da *B. abortus* como um agonista deste receptor (Huang *et al.*, 2005). Além disso, a importância da ativação dos receptores TLRs no controle da brucelose murina foi demonstrada por Macedo *et al.*, 2008 utilizando camundongos deficientes em MyD88, importante molécula adaptadora na sinalização dos TLRs. Neste contexto, encontra-se IRAK-4, molécula integrante dessa via de sinalização, posicionada imediatamente *downstream* à MyD88. O estudo do papel da molécula IRAK-4

na resposta imune durante à infecção pela bactéria intracelular *B. abortus* foi o principal objetivo deste trabalho.

Inicialmente, foi observado que IRAK-4 é fundamental no controle da *Brucella* na 1ª semana após a infecção. Já na 3ª e 6ª semanas, os animais deficientes em IRAK-4 infectados com *B. abortus* foram capazes de controlar a infecção de maneira similar aos animais heterozigotos utilizados neste estudo. Um trabalho semelhante do nosso grupo foi realizado por Macedo *et al.*, (2008), em que os autores avaliaram a participação de MyD88 no controle da infecção pela *Brucella*. A molécula adaptadora MyD88 demonstrou ser fundamental no controle da infecção pela *Brucella* em todos os tempos avaliados (1, 2, 3 e 6 semanas). Apesar de ser atribuído a IRAK-4 um papel essencial na continuação da sinalização dependente de MyD88 (Suzuki *et al.*, 2002a), aqui a molécula IRAK-4 foi necessária para o controle *in vivo* da *Brucella*, apenas na 1ª semana após a infecção. Dessa maneira, o controle da infecção pela *Brucella* após a 1ª semana de infecção é dependente de MyD88, mas parece ser independente de IRAK-4, o que sugere uma via alternativa com a participação de outras moléculas na transdução de sinal durante a ativação da resposta imune inata.

A importância de IRAK-4 na resposta imune *in vivo* induzida por um patógeno, já foi demonstrada. Camundongos deficientes em IRAK-4 são susceptíveis a infecção pela bactéria *Staphylococcus aureus*. Após a infecção por esta bactéria, 100% dos camundongos IRAK-4^{-/-} infectados sucumbiram à infecção em 10 dias (Suzuki *et al.*, 2002a). Além disso, pacientes com uma deficiência autossômica recessiva em IRAK-4 possuem uma maior susceptibilidade a infecções recorrentes por bactérias piogênicas como *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Suhir & Etzioni, 2009). É interessante notar que nestes pacientes, a maior susceptibilidade a essas infecções acontecem na infância, contudo diminui com o aumento da idade. Suhir & Etzioni, (2009)

sugerem que isso possa acontecer devido a redundâncias encontradas na resposta imunológica.

Analisando-se ainda fatores diretamente ligados ao controle da brucelose como, a produção das citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α , foi possível observar que IRAK-4 é uma importante molécula na indução de uma resposta imune de perfil Th1. Camundongos deficientes em IRAK-4 infectados com *B. abortus* tiveram uma menor produção sistêmica de IL-12. A produção de IFN- γ e TNF- α pelas células do baço de animais infectados com a *B. abortus* e re-estimuladas com a bactéria também se mostrou parcialmente dependente de IRAK-4. É importante observar, que em relação à produção IFN- γ , a maior diferença na produção desta citocina entre os animais IRAK-4^{+/+} e IRAK-4^{-/-} foi na 1ª semana após a infecção, período no qual foi observada uma maior susceptibilidade à infecção pelos camundongos IRAK-4^{-/-}. A partir da 3ª semana, apesar da produção de IFN- γ ainda ser inferior nos animais deficientes em IRAK-4, estes foram capazes de resolver a infecção de forma similar aos animais controle. Ademais, os animais IRAK-4^{-/-} foram capazes de produzir níveis detectáveis de IL-12, TNF- α e IFN- γ , diferentemente do que foi observado nos camundongos MyD88^{-/-}, em que a produção dessas citocinas pelos esplenócitos dos animais infectados foi abolida (Macedo *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos têm evidenciado que uma resposta envolvendo a produção das citocinas IL-12 e IFN- γ é essencial no controle da brucelose. Camundongos deficientes em IFN- γ apresentam uma maior susceptibilidade à infecção pela *Brucella* do que camundongos que apresentam uma produção normal desta citocina (Murphy *et al.*, 2001). É neste contexto que a produção de IL-12 se faz necessária, uma vez que ela é a principal responsável em polarizar os linfócitos para uma resposta do tipo Th1 e ativar as células NK para a produção de IFN- γ (Abbas *et al.*, 2008). Camundongos que tiveram a IL-12 depletada, por meio da inoculação de anticorpos anti-IL-12, foram mais susceptíveis à

Brucella e isto foi relacionado com uma menor produção de IFN- γ pelos esplenócitos desses animais (Zhan & Cheers, 1995). Além disso, a maior susceptibilidade à infecção pela *Brucella* observada nos camundongos Balb/c foi vista como sendo devido a uma menor expressão do receptor de IL-12 e, conseqüentemente, indução da produção de IFN- γ (Sathiyaseelan *et al.*, 2006).

Ko *et al.*(2002), demonstraram ainda que o controle da infecção por *B. abortus* depende da imunidade adquirida mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ . Assim, a participação de IRAK-4 na ativação da produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e pelas células NK1.1⁺/CD3⁻, foi avaliada no presente trabalho. Uma menor produção desta citocina pelos animais IRAK-4^{-/-} infectados com *B. abortus*, foi observada em todos os tipos celulares avaliados (CD4⁺, CD8⁺ e NK1.1⁺/CD3⁻), na primeira semana após a infecção. Este resultado indica a participação de IRAK-4 na sinalização intracelular nestas células para a produção de IFN- γ .

Em relação ao envolvimento de IRAK-4 na ativação de células T, existem na literatura alguns resultados controversos. Foi demonstrado que esta molécula pode estar envolvida na resposta de células T *in vivo*, sendo importante, principalmente na ativação de NF- κ B via o receptor de células T (TCR). As células T deficientes em IRAK-4 apresentaram uma menor produção de IL-2 e uma menor capacidade proliferativa (Suzuki *et al.*, 2006). Esses autores também observaram que a proliferação de linfócitos T CD8⁺ específicos ao vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) foi abolida em camundongos que não possuíam IRAK-4 (Suzuki *et al.*, 2006). Resultados semelhantes aos demonstrados por Suzuki *et al.*, (2006) foram obtidos por Lye *et al.*, (2008). Esses autores também observaram que camundongos deficientes em IRAK-4 possuíam uma reduzida proliferação de células T frente à infecção por LCMV quando comparados aos animais controle. Além

disso, a produção de IFN- γ e TNF- α pelos linfócitos T CD8⁺ foi reduzida (Lye *et al.*, 2008).

Apesar dessa evidência sugerindo a importância de IRAK-4 na resposta de células T, o trabalho de Kawagoe *et al.*, (2007) demonstrou que IRAK-4 não está envolvida na sinalização via o TCR assim como na proliferação de linfócitos T CD8⁺. Em relação a essa discrepância, Kawagoe *et al.*, 2007 sugerem que isto pode ser devido a diferenças no *background* genético dos animais IRAK-4^{-/-} utilizados. Lye *et al.*, (2008) utilizaram como *background* genético camundongos 129/J x C57BL/6, enquanto que Kawagoe *et al.*, (2007) utilizaram como *background* genético camundongos 129/Sv x C57BL/6.

Outros estudos revelaram o papel de IRAK-4 em células NK e foi observado que IRAK-4 é importante para a sinalização nestas células. A atividade citotóxica das células NK quando estimulados por IL-18, demonstrou ser dependente de IRAK-4 (Suzuki *et al.*, 2003). Além disso, Kanakaraj *et al.*, (1999) demonstraram que a produção de IFN- γ por células NK na infecção por citomegalovírus murino foi menor nos camundongos deficientes em IRAK, enquanto que a atividade citotóxica dessas células permaneceu inalterada.

Por fim, também foi avaliado o papel de IRAK-4 na indução de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células dendríticas e na ativação da sinalização intracelular em macrófagos. Essas células são essenciais no desencadeamento da resposta imune inata e, conseqüentemente, em uma efetiva ativação da resposta imune adaptativa. Foi observado que a produção de IL-12 e TNF- α , em macrófagos (peritoneais e derivados de medula óssea) e em células dendríticas derivadas de medula óssea, é dependente de IRAK-4. Isso demonstra que a molécula IRAK-4 é importante na indução da produção dessas citocinas frente ao reconhecimento da *Brucella*. Os resultados obtidos neste estudo também corroboraram com a idéia da importância desta molécula na via de sinalização dos TLRs.

Macrófagos e células dendríticas deficientes em IRAK-4 demonstraram um bloqueio na produção de IL-12 e TNF- α , quando Pam3CSK4 e CpG foram utilizados como estímulos, agonistas de TLR2 e TLR9, respectivamente. Vários autores também observaram que macrófagos deficientes em IRAK-4 foram incapazes de produzir mediadores inflamatórios em resposta ao tratamento com agonistas de TLRs (Suzuki *et al.*, 2002; Kawagoe *et al.*, 2007, Lye *et al.*, 2008).

Recentemente, Macedo *et al.* (2008) demonstraram que BMDCs, deficientes em MyD88 e estimuladas com *Brucella* apresentaram a produção de IL-12 e TNF- α bloqueadas, confirmando que essa via é essencial para a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela *Brucella*. Neste presente trabalho, em relação às BMDC, foi possível observar, uma significativa produção de IL-12 e TNF- α , nos camundongos deficientes em IRAK-4, quando estas células foram estimuladas com LPS de *E. coli*, mas não com a *Brucella*. Isso se deve ao fato de que para esse agonista há uma via alternativa de ativação da produção de citocinas, independente de MyD88. A ativação de TLR4 por LPS pode ser realizada por meio da molécula adaptadora TRIF (Yamamoto *et al.*, 2004).

A sinalização intracelular envolvida na expressão de citocinas pró-inflamatórias foi avaliada em macrófagos derivados de medula óssea, deficientes ou não para a molécula IRAK-4. Nesse estudo, foi demonstrado que IRAK-4 é fundamental para a ativação das MAP cinases, ERK1/2 e p38, bem como na ativação de NF- κ B quando estas células foram estimuladas com a *B. abortus*. Resultados semelhantes foram obtidos quando Kawagoe *et al.*, (2007) utilizaram MALP-2, um agonista de TLR2/TLR6, como estímulo em BMM ϕ . Os autores verificaram, que sob ativação de TLR2/TLR6, células deficientes em IRAK-4 não apresentaram fosforilação das MAP cinases (JNK, p38 e ERK1/2) bem como não foi observada a degradação de I κ B α e a fosforilação de p65, ambos indicadores da ativação de NF- κ B (Kawagoe *et al.*, 2007). Outros trabalhos também demonstraram a participação de

IRAK-4 na ativação de NF- κ B utilizando agonistas de TLRs como indutores dessa ativação (Suzuki *et al.*, 2002a, Fraczek *et al.*, 2008)

A importância de MyD88 na via de sinalização envolvendo as MAP cinases e o NF- κ B também foi demonstrada nesse estudo. A fosforilação de ERK1/2, p38 e da subunidade p65 induzidas por *B. abortus* se mostrou dependente de MyD88. Essa observação está de acordo com o bloqueio da produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos deficientes para essa molécula adaptadora (Macedo *et al.*, 2008). A dependência de MyD88 na via dos TLRs para ativação de MAP cinases e o NF- κ B foi observada por Kawagoe *et al.*, (2007). É importante ressaltar, contudo, que os TLR3 e TLR4 são capazes de sinalizar por uma via independente de MyD88 (Yamamoto *et al.*, 2004). Esse fato pode explicar a fosforilação das MAP cinases e da subunidade p65 do NF- κ B em 30 e 60 minutos após a estimulação dos macrófagos com LPS, um agonista de TLR4.

De maneira interessante, a ativação tardia de NF- κ B foi observada nas células deficientes em IRAK-4 em ensaios de troca de mobilidade eletroforética (EMSA) quando os macrófagos foram estimulados com MALP-2. O mesmo não foi observado em células deficientes em MyD88. Além disso, a ativação tardia de NF- κ B via TLR7/TLR8 e TLR9 demonstrou ser independente de IRAK-4 (Kawagoe *et al.*, 2007). Esses autores, sugerem dessa maneira, uma via alternativa de ativação para alguns TLRs dependente de MyD88 e independente de IRAK-4.

A família das cinases associadas ao receptor de interleucina-1 (IRAK) é constituída atualmente por 4 membros, dos quais três deles, IRAK-1, IRAK-2 e IRAK-4, estão relacionados a transdução de sinal na ativação da via dos TLRs e do receptor de IL-1 (Cao *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002). Um papel redundante dessas moléculas na sinalização intracelular poderia então ser sugerido.

Em relação à IRAK-1, alguns trabalhos já confirmaram que a participação dessa molécula na sinalização intracelular é dependente da sua fosforilação por IRAK-4 (Suzuki *et al.*, 2002b; Kawagoe *et al.*, 2007). Já em relação à IRAK-2, trabalhos relacionaram esta molécula como essencial para uma ativação tardia de NF- κ B (Kawagoe *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2009). Kawagoe *et al.*, (2008) verificaram que IRAK-2 possui um papel mais proeminente do que IRAK-1 na sinalização em fases tardias da ativação via TLRs. Entretanto, Keating *et al.*, 2007 utilizando siRNAs, sugerem a possibilidade da ativação de NF- κ B utilizando uma via dependente de IRAK-2 e de MyD88, mas independente de IRAK-4 e IRAK-1. Ademais, esses autores também sugerem que IRAK-2 se liga diretamente a MAL, uma molécula adaptadora dos TLR2 e TLR4. Por meio de ensaios de imunoprecipitação foi demonstrado ainda, que IRAK-2 interage diretamente com o TLR3. Dessa maneira, IRAK-2 poderia ser um candidato a desempenhar um papel em fases tardias da sinalização pelos receptores TLRs, em uma via independente de IRAK-4.

Em resumo, neste presente trabalho foi observado que IRAK-4 é uma molécula mediadora da sinalização via TLRs essencial para o controle da brucelose murina em fases iniciais da infecção pela *B. abortus*. Este fato coloca a resposta imune inata desenvolvida durante a infecção causada pela *B. abortus* como um processo dependente de IRAK-4. Um ponto a ser considerado, entretanto, é que os animais infectados com *B. abortus* conseguem resolver a infecção por este patógeno mesmo na ausência de IRAK-4 a partir da 3ª semana. Dessa maneira, a resposta imune em fases mais tardias na infecção pela *Brucella* parece acontecer de maneira independente de IRAK-4, mas dependente de MyD88. Considerando que mais de um TLR é ativado em reconhecimento à *B. abortus* (Campos *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003, Weiss *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2008) é plausível considerar a possível existência de uma via dependente de MyD88 e independente de IRAK-4, ativada durante a resposta a uma infecção por *Brucella*.

6. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o envolvimento de IRAK-4 no controle inicial da infecção pela bactéria *Brucella abortus* e na sinalização celular ativada por esta bactéria. A deficiência de IRAK-4 acarreta em uma redução significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e células dendríticas ativadas pela *Brucella*. Além disso, a sinalização celular em macrófagos via as MAP cinases e NF- κ B induzida pela *B. abortus* é dependente de IRAK-4. Ademais, foi observado que no estágio inicial da infecção pela *Brucella*, IRAK-4 é importante para uma efetiva resposta do tipo 1, tendo em vista que esta molécula participa da ativação de diferentes tipos celulares como linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e células NK para a produção de IFN- γ . Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que IRAK-4 é essencial para o controle inicial da infecção pela *B. abortus*, mas não em fases mais tardias desse processo infeccioso.

7. Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. 2008. *Imunologia Celular E Molecular*. 6. Ed. Saunders, 564 p.
- Akira, S. 2006. TLR Signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311: 1-16.
- Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology.* 8: 675-680.
- Aktas, M.; Wessel, M.; Hacker, S.; Klüsener, S.; Gleichenhagen, J.; Narberhaus, F. 2010. Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. *European Journal of Cell Biology.* 1-7.
- Albiger, B.; Dahlberg, S.; Henriques-Normark, B.; Normark, S. 2007. Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J. Intern. Med.* 261: 511-528.
- Alton, G.G.; Forsyth, J.R.L. 1999. *Brucella*: <http://129.109.112.248/microbook/ch028.htm>.
- Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D.; Verger, J. M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, *et al.* 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 9247-52.
- Araya, L.M., Elzer, P.H., Rowe, G.R., Enright, R.M., Winter, A.J., 1989. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *The Journal of Immunology.* 143: 3330-3337.
- Archambaud, C.; Salcedo, S. P.; Lelouard, H.; Devillard, E.; Bovis, B.; Van Rooijen, N.; Gorvel, J. P.; Malissen, B. 2010. Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *European Journal Immunology.* 40: 3458-3471.
- Armant, M. A., Fenton, M. J. 2002. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* 29: 3011-3021.

- Audic, S.; M. Lescot, *et al.* 2009. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics*. 10: 352.
- Barquero-Calvo, E.; Chaves-Olarte, E.; Weiss, D. S.; Guzmán-Verri, C.; Chácon-Díaz, C.; Rucavado, A.; Moriyón, I.; Moreno, E. 2007. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PloS One*. 7:e631.
- Bessoles, S.; Dudal, S.; Besra, G. S.; Sanchez, F.; Lafont, V. 2009. Human CD4+ invariante NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms. *European Journal of Immunology*. 39: 1025-1035.
- Billard, E.; Dornand, J.; Gross, A. 2007. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infection and Immunity*. 75: 5916-5923.
- Bouma, G., Doffinger, R., Patel, S., Peskett, E., *et al.* 2009. Impaired neutrophil migration and phagocytosis in IRAK-4 deficiency. *British Journal of Haematology*. 1-4.
- Brzezinska, A. A.; Johnson, J. L.; Munafo, B. A.; Catz, E.; Catz, S. D. 2008. Signalling mechanisms for Toll-like receptor-activated neutrophil exocytosis: key roles for interleukin-1-receptor-associated kinase-4 and phosphatidylinositol 3-kinase but not Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF). *Immunology*. 11-12.
- Carmichael, L. E. 1990. *Brucella canis*. In: Animal Brucellosis. K. Nielsen and J. R. Duncan, eds. CRC Press, Inc., p.335-350.
- Campos, M. A., G. M. S. Rosinha, I. C. Almeida, X. S. Salgueiro, B. W. Jarvis, G. A. Splitter, N. Qureshi, O. Bruna-Romero, R. T. Gazzinelli and S. C. Oliveira. 2004.

- 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.
- Cao, Z., W. J. Henzel and X. Gao. 1996. IRAK: A Kinase Associated with the Interleukin-1 receptor. *Science.* 17: 1128-1131.
- Celli, J. 2006. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res. Microbiology.* 157: 93-98.
- Cloeckaert, A., Grayon, M., Grépinet, O., Boumedine, K.S., 2003. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes and Infection.* 5: 593-602.
- Cloeckaert, A.; Verger, J. M.; *et al.* 2001. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes & Infection.* 3: 729-738.
- Cheers, C., Ho, M., 1983. 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.
- Copin, R.; De Baetselier, P.; Carlier, Y.; Letesson, J. J.; Muraille, E. 2007. MyD88-dependent activation of B220⁻CD11b⁺LY-6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *Journal of Immunology.* 178: 5182-5191.
- Corbel, M.J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases.* 2: 213-221.
- Corbel, M. J.; Morgan, W. J. B. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173AL. In: Holt, J.G., editor. Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. Baltimore (MD): Williams & Wilkins, p.377-388.

- Christopher, S.; Umapathy, B. L.; Ravikumar, K. L. 2011. Brucellosis: Review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of Laboratory Physicians*. 2: 55-60.
- Cirl, C.; Wieser, A.; Yadav, M.; Duerr, S.; Schubert, S.; Fischer, H.; Stappert, D.; Wantia, N.; Rodriguez, N.; Wagner, H.; Svanborg, C.; Miethke, T. 2008. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med*. 14: 399-406.
- Detilleux, P.G.; Deyoe, B.L.; Cheville, N.F. 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. *Infect. Immun*. 58: 2320-2328.
- Diacovich, L.; Gorvel, J. P. 2010. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 117-128.
- Dudal, S.; Turriere, C.; Bessoles, S.; Fontes, P.; Sanchez, F.; Liautard, J.; Liautard, J. P.; Lafont, V. 2006. Release of LL-37 by activated human V γ 9V δ 2 T cells: A microbicidal weapon against *Brucella suis*. *Journal of Immunology*. 177: 5533-5539.
- Fernandes, D. M.; Bensor, R.; Baldwin, C. L. 1995. Lack of a role of natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. *Infection and Immunity*. 63: 4029-4033.
- 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. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med*. 198: 1043-55.
- Flannery, S. and Bowie A. G. 2010. The interleukin-1 receptor-associated kinases: Critical regulators of innate immune signaling. *Biochemical Pharmacology*. 1-11.

- Forestier, C.; Deleuil, F.; et al. 2000. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *Journal of Immunology*. 165: 5202-5210.
- Frazeck, J.; Kim, T. W.; Xiao, H.; Yao, J.; Wen, Q.; Li, Y.; Casanova, J. L.; Pryjma, J.; Li, X. 2008. The kinase activity of IL-1 receptor-associated kinase 4 is required for interleukin-1 receptor/Toll-like receptor-induced TAK1-dependent NF-κB activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 283: 31697-703.
- Freney, J.; Renaud, F.; Hansen, W.; Bollet, C. 2000. *Pres de Bacteriologie Clinique*. Paris: ESKA. p.1413-1423.
- Giambartolomei, G. H.; Zwerdling, A.; Cassataro, J.; Bruno, L.; Fossati, C. A.; Philipp, E M. T. 2004. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J. Immunol*. 173: 4635-42.
- Golding, B., Scott, D. E.; Scharf, O.; Huang, L. Y., Zaitseva, M.; Lapham, C.; Eller, N.; Golding, E H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection*. 3: 43-8.
- Gomes, M. S.; Appelberg, R. 2002. NRAMP1- or cytokine-induced bacteriostasis of *Mycobacterium avium* by mouse macrophages is independent of the respiratory burst. *Microbiology*. 148: 3155-3160.
- Gonçalves, V. S. P.; Delphino, M. K. V. C.; Dias, R. A.; Ferreira, F.; Amaku, M.; Ferreira Neto, J. S.; Porto, T. B.; Alves, C. M.; Figueiredo, V. C. F.; Lôbo, J. R. 2009. Epidemiological status of bovine brucellosis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 61: 35-45.

- Gorvel, J. P.; Moreno, E. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90: 281-97.
- 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. 2005. 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.
- Huang, L-Y.; Ishii, K. J.; Akira, S.; Aliberti, J.; Golding, B. 2005. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *The Journal of Immunology.* 175: 3964-3970.
- Huang, L.Y., J. Aliberti, C. A. Leifer, D. M. Segal, A. Sher, D. T. Golenbock and B. Golding. 2003. 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. *The Journal of Immunology.* 171: 1441-1446.
- Huang, L. Y.; Reis e Souza, C.; Itoh, Y.; Inman, J.; Scott, D. E. 2001. IL-12 induction by a Th1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cells subsets and regulation by IL-10. *Journal of Immunology.* 167: 1423.
- Inohara, N.; Nunez, G. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews immunology.* 3: 371-385.
- Janssens, S.; Beyaert, R. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell.* 11: 293-302.
- Jimenez de Bagues, M. P.; Dudal, S.; Dornand, J.; Gross, A. 2005. Cellular bioterrorism: How *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin. Immunol.* 114: 227-38.

- Jones, S.M.; Winter, A.J. 1992. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 60: 3011-3014.
- Jong, M.; Rolán, H. G.; Tsolis, R. M. 2010. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: Brucella. *Cellular Microbiology.* 1-8.
- Kanakaraj, P., P. H. Schafer, D. E. Cavender, Y. Wu, K. Ngo, P. F. Grealish, S. A. Wadsworth, P. A. Peterson, J. J. Siekierka, C. A. Harris and W. P. F. Leung. 1998. Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J. Exp. Med.* 187: 2073-2079.
- Kawagoe, T., S. Sato, Matsushita, K., H. Kato, K. Matsui, Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., and S. Akira. 2008. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK-1 and IRAK-2. *Nature Immunology.* 9: 684-691.
- Kawagoe, T., S. Sato, A. Jung, M. Yamamoto, K. Matsui, H. Kato, S. Uematsu, O. Takeuchi and S. Akira. 2007. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *JEM.* 204: 1013-1024.
- Kawai, T.; Akira, S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology.* 21: 317-337.
- Keating, S. E.; Maloney, G. M.; Moran, E. M.; Bowie, A. G. 2007. IRAK-2 participates in multiple Toll-like receptor signaling pathways to NF- κ B via activation of TRAF6 ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry.* 282: 33435-33443.

- Kim, T. W.; Staschke, K.; Bulek, K.; Yao, J.; Peters, K.; Oh, K. H.; Vandenburg, Y.; Xiao, H. *et al.* 2007. A critical role for IRAK-4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity. *JEM.* 204: 1025-1036.
- Ko, J.; Gendron-Fitzpatrick, A.; Splitter, G. A. Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *Journal of immunology.* 168: 2433-2440.
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galán, J. E., Janeway Jr., C. A., Medzhitov, R., Flavell, R. A. 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 110: 191-202.
- Li, S., A. Strelow, E. J. Fontana and H. Wesche. 2002. IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *PNAS.* 99: 5567-5572.
- Lye, E.; Dhanji, S.; Calzascia, T.; Elford, A.; Ohashi, P. S. 2008. IRAK-4 kinase activity is required for IRAK-4-dependent innate and adaptive immune responses. *Eur. J. Immunol.* 38: 870-876.
- Lye, E.; Mirtsos, C.; Suzuki, N.; Suzuki, S.; Yeh, W. C. 2004. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 40653-40658.
- Macedo, G. C., D. M. Magnani, N. B. Carvalho, O. Bruna-Romero, R. T. Gazzinelli and S. C. Oliveira. 2008. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *The Journal of Immunology.* 180: 1080-1087.
- Martin, N.L.; Hancock, R.E.W. 1990. Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria. In: *Advances in Brucellosis research*, G. Addams ed. Texas A and M-University Press. College Station, p.55-75.

- McDonald, D. R.; Goldman, F.; Gomez-Duarte, O. D.; Issekutz, A. C.; Kumararatne, D.; Doffinger, R.; Geha, R. S. 2010. Impaired T-cell receptor activation in IL-1 receptor-associated kinase-4-deficient patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1-7.
- Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Janeway, C. A. J. R. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll proteins signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388: 394-397.
- Meyer, M. 1990. 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.
- Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyon, I., 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology.* 90: 209-227.
- Moreno, E.; Stackebrandt, E.; Dorsch, M.; Wolters, J.; Busch, M.; Mayer, E. H. 1990. *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.
- Moreno, E.; Berman, D. T.; Boettcher, L. A. 1981. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity.* 31: 362-370.
- Moriyon, I. 2003. Against gram-negative bacteria: the LPS case. In intracellular pathogens in membrane interactions and vacuole biogenesis. *Landes Bioscience.*
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2010. *Imunobiologia de Janeway.* 7.ed. Artmed. 908p.

- Murphy, E. A., Sathiyaseelan, J., Parent, M. A., Zou, B., Baldwin C. L., 2001. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*. 103: 511-518.
- Muzio, M., J. Ni, P. Feng and V. M. Dixit. 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. 1997. *Science*. 278: 1612-1615.
- Nicoletti, P. L. 2002. A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol*. 90:5-9.
- Nicoletti, P. L. 1989. 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.
- Oliaro, J.; Dudal, S.; Liautard, J.; Andrault, J. B.; Liautard, J. P.; Lafont. V. 2005. V γ 9V δ 2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria *Brucella*. *Journal of Leukocyte Biology*. 77:652-660.
- Oliveira, S. C.; Oliveira, F.S.; Macedo, G.C.; de Almeida, L.A.; Carvalho, N.B. 2008. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect*. 10:1005-9.
- Oliveira, S. C.; Splitter, G. A. 1995. CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45 RB^{lo} 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.
- O'Neill, L. A. J. 2008. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological Reviews*. 226: 10-18.

- O'Neill, L. A. J.; Bowie, A. G. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*. 7: 353-364.
- Ottonnes, F.; Dornand, J.; Naroeni, A.; Liautard, J. P.; Favero, J. 2000. V γ 9V δ 2 T cells impair intracellular multiplication of *Brucella suis* in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect. *The journal of immunology*. 165: 7133-7139.
- Pappas, D. G.; Papadimitriou, P.; Akriditis, N.; Christou, L.; Tsianos, E. V. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Disease*. 6: 91-99.
- Pappas, D. G.; Akriditis, N.; Bosilkovski, M. et al. 2005. Brucellosis. *N. Engl. J. Med*. 352: 2325-36.
- Pasquali, P.; Adone, R.; Gasbarre, L. C.; Pistoia, C.; Ciuchini, F. 2001. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infection and Immunity*. 69: 6541-6544.
- Pasquevich, K.A., Ibañez, A.E., Coria, L.M., García Samartino, C., Estein, S.M., Zwedling, A., Barrinuevo, P., Oliveira, F.S., Seither, C., Warzecha, H., Oliveira, S.C., Giambartolomei, G.H., Cassataro, J. 2011. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS One*. 6:e16203.
- Pasquevich, K.A., García Samartino, C., Coria, L.M., Estein, S.M., Zwedling, A., Ibañez, A.E., Barrinuevo, P., Oliveira, F.S., Carvalho, N.B., Borkowski, J., Oliveira, S.C., Warzecha, H., Giambartolomei, G.H., Cassataro, J. 2010. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *Journal of Immunology*. 184, 5200-5212.

- Pizarro-Cerdá, J.; Méresse, S.; Parton, R.G.; Goot, G.; Sola-Landa, A.; Lopez-Goñi, I.; Moreno, E.; Gorvel, J.P. 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non-professional phagocytes *Infect. Immun.*66: 5711-5724.
- Poster, P. F.; Gonçalves, V. S. P.; Lage, A. P. 2002. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology.*90: 55-92.
- Radhakrishnan, G. K.; Yu, Q.; Harms, J. S.; Splitter, G. A. 2009. *Brucella* TIR domain-containing protein mimics properties of the Toll-like receptor adaptor protein TIRAP. *J. Biol. Chem.* 284: 9892-9898.
- Re, F.; Strominger, J. L. 2004. Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. *Immunobiology.* 209: 191-198.
- Salcedo, S. P.; Marchesini, M. I.; Lelouard, H.; Fugier, E.; Jolly, G.; Balor, S. Muller, A.; Lapaque, N.; Demaria, O.; Alexopoulou, L.; Commerci, D. J.; Ugalde, R. A.; Pierre, P.; Gorvel, J. P. 2008. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog.* 4: e21.
- Sangari, F.J.; Agüero, J. 1996. Molecular basis of *Brucella* patogenicity: An update. *Microbiología SEM.* 12: 207-218.
- Sathiyaseelan, J.; Goenka, R.; Parent, M.; Benson, R. M.; Murphy, E. A; Fernandes, D. M.; Foulkes A. S.; Baldwin, C. L. 2006. Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cellular Immunology.* 243:1-9.
- Seki, M., Kohno, S., Newstead, M. Z., Zeng, X., Bhan, U., Lukacs, N. W. *et al.* 2010. Critical role of IL-1 receptor-associated kinase-M in regulating chemokine-

- dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia. *J. Immunol.* 184: 1410-8
- Shoclz, H. C.; K. Nockler, et al. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 801-808.
- Smith, L. D.; Ficht, T. A. 1990. Pathogenesis of *Brucella*. *Crit. Rev. Microbiology.* 17: 209-230
- Solera, J. 2010. Update on brucellosis: therapeutic challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 36: 18-20.
- Suhir, H.; Etzioni, A. 2009. The role of Toll-like receptor signaling in human immunodeficiencies. *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* 1-9.
- Suzuki, N., S. Suzuki, D. G. Millar, M. Uno, H. Hara, T. Calzascia, S. Yamasaki, T. Yokosuba, N. J. Chen, A. R. Elford, J. I. Suzuki, A. Takeuchi, C. Mirtsos, D. Bouchard, P. S. Ohashi, W. C. Yeh and T. Saito. 2006. A critical role for the innate immune signaling molecule IRAK-4 in T cell activation. *Science.* 311: 1927-1931.
- Suzuki, N., N. J. Chen, D. G. Millar, S. Suzuki, T. Horacek, H. Hara, D. Bouchard, K. Nakanishi, J. M. Penninger, P. S. Ohashi and W. C. Yeh. 2003. IL-1 receptor-associated kinase 4 is essential for IL-18-mediated NK and Th1 cell responses. *J. Immunol.* 170: 4031-4035.
- Suzuki, N., S. Suzuki, G. S. Duncan, D. G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J. M. Penninger, H. Wesche, P. S. Ohashi, T. W. Mak and W. Yeh. 2002a. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4. *Nature.* 416: 750-754.
- Suzuki, N., S. Suzuki, W. Yeh. 2002b. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends in Immunology.* 23: 503-506.754.

- Thomas, J. A., J. L. Allen, M. Tsen, T. Dubnicoff, J. Danao, X. C. Liao, Z. Cao, S. A. Wasserman. 1999. Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J. Immunol.* 163: 978-984.
- Uematsu, S.; Akira, S. 2007. Toll-like Receptors and Type I Interferons. *J. Biol. Chem.* 282: 15319- 15323.
- Ugalde, J. E.; D. J. Comerci *et al.* 2003. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutan as a new live rough-phenotype vaccine. *Infection and Immunity.* 71: 6264-6269.
- Ugalde, R. A. 1999. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes and Infection.* 1:1211-9.
- Vassalo, D. J. 1992. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. *Journal of the Royal Naval Medical Corps.* 138:140-150.
- Vasselon, T.; Detmers, A. 2002. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect. Immun.* 70: 1033-1041.
- Verger, J. M.; Grimont, F.; Grimont, P. A. D., Grayon, M. 1985. *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 292-5.
- Wan, Y., Xiao, H.; Affolter, J.; Kim, T. W.; Bulek, K.; Chaudhuri, S. *et al.* 2009. IL-1 receptor-associated kinase 2 is critical for LPS-mediated post-transcriptional control. *J. Biol. Chem.* 284:10367-75.
- Weiss, D.S., K. Takeda, S. Akira, A. Zychlinsky and E. Moreno. 2005. MyD88, but not Toll-Like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 73: 5137-5143.

- Wesche, H., X. Gao, X. Li, C. J. Kirschning, G. R. Stark and Z. Cao. 1999. IRAK-M is a novel member of the Pelle/Interleukin-1 receptor-associated Kinase (IRAK) family. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 19403-19410.
- Winter, A.J., Duncan, J.R., Santisteban, C.G., Douglas, J.T., Adams, L.G., 1989. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *B. abortus* infection in mice. *Infection and Immunity*. 57: 3438-3444.
- WHO – World Health Organization. 1998. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. The development of New improved Brucellosis Vaccines: report of a WHO Meeting, Geneva.
- Wyatt, H. V. 1999. Royal Navy Surgeons and the transmission of brucellosis by goat's milk. *Journal of the Royal Naval Medical Service*. 85:112-117.
- Yamamoto, M.; Takeda, K.; Akira, S. 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Molecular immunology*. 40: 861-868.
- Yamamoto, M.; Sato, S.; Hemmi, H.; Hoshino, K.; Kaisho, T.; Sanjo, H.; Takeuchi, O.; Sugiyama, M.; Okabe, M.; Takeda, K.; Akira, S. 2003a. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301: 640-643.
- Yamamoto, M.; Sato, S.; Hemmi, H.; Sanjo, H.; Uematsu, S. 2003b. TRAM is specifically involved in the toll-like receptor 4 mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature immunology*. 4: 1144-50.
- Young, E. J. 1988. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. *APMIS*. 3: 17-20.
- Zhan, Y. and Cheers, C. 1995. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*. 63:1387-1390.
- Zhu, J. and Mohan, C. 2010. Toll-like receptor signaling pathways-Therapeutics Opportunities. *Mediators of Inflammation*. 1-7.

Zwerdling, A.; Delpino, M. V.; Pasquevich, K. A.; Barrionuevo, P.; Cassataro, J.; Samartino, C, G.; Giambartolomei, G. H. 2009. *Brucella abortus* activates human neutrophils. *Microbes and Infection*. 11: 689-697.

8. Anexos

Artigos Publicados:

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

Pasquevich, K.A., García Samartino, C., Coria, L.M., Estein, S.M., Zwedling, A., Ibañez, A.E., Barrinuevo, P., **Oliveira, F.S.**, Carvalho, N.B., Borkowski, J., Oliveira, S.C., Warzecha, H., Giambartolomei, G.H., Cassataro, J. 2010. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *Journal of Immunology.* 184, 5200-5212.

Oliveira SC, Macedo GC, Almeida LA, **Oliveira FS**, Oñate, A, Cassataro, J, Giambartolomei, GH. 2010. Recent advances in understanding immunity against brucellosis: application for vaccine development. *The Open Veterinary Science Journal.*4:101-107.

Pasquevich, K.A., Ibañez, A.E., Coria, L.M., García Samartino, C., Estein, S.M., Zwedling, A., Barrinuevo, P., **Oliveira, F.S.**, Seither, C., Warzecha, H., Oliveira, S.C., Giambartolomei, G.H., Cassataro, J. 2011. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS One.* 6:e16203.

Carvalho, N.B.; **Oliveira, F.S.**; Durães, F.V.; Almeida, L. A.; Florido, M.; Prata, L. O.; Caliari, M. V.; Appelberg, R.; Oliveira, S. C. 2011. Toll-like receptor 9 is required for full host resistance to *Mycobacterium avium* infection but plays no role in induction of Th1 responses. *Infection and Immunity*. 79: 1638-1646.

Oliveira, F. S.; Carvalho, N. B.; Brandão, A. P. M. S.; Gomes, M. T. R.; Almeida L. A.; Báfica, A.; Oliveira, S. C. 2011. IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) is essential for initial host control of *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*. 79 (11): 4688-95.