



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Pós-Graduação

PATRÍCIA PAIVA CORSETTI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-10 ENDÓGENA NA INFECÇÃO PELA
BACTÉRIA *Brucella abortus* EM MODELO MURINO**



JUIZ DE FORA

2011

PATRÍCIA PAIVA CORSETTI

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-10 ENDÓGENA NA INFECÇÃO PELA
BACTÉRIA *Brucella abortus* EM MODELO MURINO**

Dissertação de mestrado apresentado ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

JUIZ DE FORA

2011

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

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e força para lutar.

Ao Professor Dr^o Sérgio Costa Oliveira, pela orientação, profissionalismo, dedicação, paciência e confiança. Foi o primeiro profissional o qual eu pedi orientação e não imaginava que, através da UFJF e do Professor Henrique, hoje estaria como sua orientanda. Grande mestre e espelho profissional.

Ao Professor Dr^o Henrique Couto Teixeira, pelo profissionalismo, co-orientação e confiança. Obrigada por possibilitar o meu amadurecimento, aprendizado e por ampliar os meus horizontes.

Ao Professor Dr^o Marcelo Caliar, pela colaboração, ensinamentos, dedicação e confiança. Gerou o meu enriquecimento profissional e crescimento como ser humano.

Ao Professor Dr^o Renato Santos, pela colaboração para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Professor Dr^o Gilson Macedo, pelo profissionalismo, ensinamentos e confiança. Além disso, um novo e grande amigo. Impossível não sentir falta da convivência alegre regada de muitas risadas.

À Teane Silva, pela colaboração e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Aos Professores da UFJF e UFMG, pelos ensinamentos. Em especial ao Professor Drº Vasco, que possibilitou a conclusão das disciplinas em seu departamento.

Aos meus eternos orientadores da EMBRABA Gado de Leite: Márcia Prata e John Furlong, pelo apoio, amizade, carinho e por serem os responsáveis a despertar em mim o gosto pela pesquisa.

A todos os amigos da Embrapa, em especial ao Dedi, pelo grande companheirismo, ensinamentos, amizade, diversão (amplexos) e fantástico bom humor. Momentos que deixam muitas saudades.

Aos meus familiares, em especial meu pai Antônio, minha mãe Elisabeth, minha irmã Andréia, meu tio Alfeu, meus sobrinhos: Matheus e Bruna, pela paciência na minha ausência, pelo amor e carinho e principalmente por acreditarem na minha luta. Amo Vocês!

Ao meu querido namorado e eterno amigo Leonardo, pelo companheirismo, ensinamentos, paciência, carinho e amor. Na quebra de paradigmas me fez entender como a amizade, profissionalismo e amor podem andar lado a lado.

À Sandra, pela dedicação, paciência e companheirismo em todas as horas.

Aos colegas da UFJF, em especial a Vivian, Osmar, Vítor, Alice, Carol, Sandra, Luciano e Caio, pelo apoio e companheirismo. A Professora Drª Ana Paula Ferreira pela confiança.

Aos colegas do LIDI, que passaram rapidamente e aos que conviveram diretamente, pela paciência, companheirismo, ensinamentos e pelas boas risadas. Obrigada a todos!

À minha querida amiga Carol, que cumprida bravamente sua missão na terra, deixa saudades. Obrigada por ter o privilégio de tê-la conhecido. Obrigada pelo tempo vivido e por ser a minha referência de infância, adolescência e vida. Obrigada pela paciência em escutar sobre os meus experimentos, mesmo quando estava acamada. Obrigada pelo apoio na vida profissional e pessoal sempre.

À minha nova amiga Carina, pelo companheirismo, ensinamentos, amizade e por introduzir-me ao mundo das boas cervejas.

À minha prima Ana D' Alessandro, pelo apoio e amizade sempre.

Às minhas grandes amigas Abiah e Rhonara (MID), pelo apoio, amizade e carinho.

Aos Valencianos: Juliana, Carol, Japa, Pedro, Renan, Tio e Tia, pelos excelentes momentos vividos, além da confiança e amizade agora mantidos à distância.

Aos meus amados animais, pela paciência, carinho, respeito e grandes responsáveis pela minha luta.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Brucella abortus é uma bactéria patogênica Gram-negativa, que causa uma doença crônica em bovinos, humanos e outras espécies denominada brucelose. A habilidade do hospedeiro em montar uma resposta tipo Th1/pró-inflamatória contra a bactéria é crucial para o controle e resolução da infecção. Evidências sugerem que a citocina IFN- γ produzida pelo perfil Th1 é crucial para o controle da infecção em camundongos. A interleucina-10 (IL-10) é conhecida por diminuir a produção de IFN- γ *in vitro* interferindo diretamente no processo da eliminação do patógeno. Durante a infecção pela *B. abortus*, a IL-10 pode atuar limitando a resposta inflamatória e favorecendo o estabelecimento da infecção persistente em camundongos. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da IL-10 endógena na infecção pela *B. abortus*. Para acessar o papel da IL-10, camundongos deficientes para IL-10 (IL-10 KO) ou 129 Sv/Ev foram infectados com a cepa S2308 de *B. abortus* e foram avaliados os números de bactérias viáveis recuperadas no baço desses animais. Uma, 2, 3, 6 e 14 semanas após infecção, camundongos IL-10 KO apresentaram menor número de bactérias recuperadas quando comparadas com o grupo controle em todos os tempos de infecção, principalmente em 14 semanas. Adicionalmente, constatou-se por análise de curva de sobrevivência em um período de 14 semanas após infecção que aproximadamente 35% dos camundongos IL-10 KO morrem somente na 2ª ou 3ª semana. Ademais, a produção de IFN- γ , IL-10, IL-17 e TNF- α foi avaliada em esplenócitos dos camundongos infectados quando estimulados *in vitro* com a *B. abortus* viva (S2308), morta pelo calor (HKBA), LPS de *E. coli* ou ConA. Os animais IL-10 KO apresentaram uma maior quantidade de IFN- γ e TNF- α no sobrenadante das células estimuladas com *Brucella* quando comparada a produção destas citocinas pelas células provenientes dos camundongos 129 Sv/Ev. A citocina IL-17 somente foi produzida pelas células dos animais IL-10 KO em todos os tempos analisados. Adicionalmente, a produção de TNF- α , IL-6, IL-12-p40, NO e IL-10 foram avaliados em macrófagos derivados da medula óssea, dos animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev. TNF- α , NO, IL-6 e IL-12 apresentaram aumento nos animais IL-10 KO apenas quando estimulados com HKBA. Entretanto, nos animais 129 Sv/Ev a bactéria viva e morta estimularam a produção de IL-10. Estas mesmas citocinas foram avaliadas em sobrenadante de cultura de células dendríticas derivadas da medula óssea. Níveis mais elevados de TNF- α e IL-12-p40 foram obtidos no

sobrenadante de células de animais IL-10 KO quando comparados ao grupo controle, em todos os tempos e estímulos da cinética de infecção. A expressão de *TGF-β* foi avaliada por PCR em tempo real em células esplênicas nos tempos 0 (não infectado), 1, 2 e 6 semanas de infecção estimulados com a bactéria viva. Na 2ª semana após infecção os animais IL-10 KO expressaram níveis mais elevados de *TGF-β* em relação ao grupo controle, porém na 6ª semana este perfil é invertido. Adicionalmente, o nível de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) presente no baço dos animais infectados foi analisado por citometria de fluxo. Esta população encontrou-se aumentada nos animais IL-10 KO a partir da 3ª e 6ª semanas após a infecção. Análises histopatológicas descritiva dos fígados destes animais durante toda a cinética de infecção demonstraram a diminuição gradativa dos granulomas nos dois grupos estudados, porém essa redução foi mais eficiente nos camundongos IL-10 KO principalmente na 6ª semana após a infecção considerando-se a área do granuloma, analisada por morfometria digital, e a recuperação do parênquima hepático. Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho suportam que a ausência da produção da IL-10 está associada a uma maior resistência à infecção pela bactéria *B. abortus* em modelo murino, através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias culminando com uma maior eliminação da bactéria e uma resolução mais rápida da patologia tecidual do hospedeiro levando, assim, a um controle efetivo da infecção.

Palavras - chave: IL-10 KO, *Brucella abortus*, Modulação Imune

ABSTRACT

Brucella abortus is a Gram-negative pathogenic bacterium which causes a chronic disease in bovine, humans and others species called brucellosis. The host ability to mount a Th1/pro-inflammatory response against the bacteria is crucial to control and to solve the infection. It is suggested that IFN- γ produced by Th1 cells is crucial to control the infection in mice. The interleukin IL-10 is considered to be responsible to decrease the IFN- γ production *in vitro* interfering directly in the pathogen elimination. During *B. abortus* infection, IL-10 acts limiting inflammatory response favoring the establishment persistence infection in mice. The goal of this study was evaluated the role of endogenous IL-10 during *B. abortus* infection. To assess the role of IL-10 *in vivo*, IL-10 knockout (IL-10 KO) mice or 129 Sv/Ev mice were infected with *B. abortus* strain S2308 and the number of viable bacteria recovery from the spleen were evaluated. One, 2, 3, 6 and 14 weeks post infection, IL-10 KO mice showed lower number of bacteria in the spleen when compared to wild type mice during all the time points. It was observed the increase of the difference at 14th week post infection. Additionally, it was demonstrated by survival curve in a period of 14 weeks post infection that approximately 35% of IL-10 KO mice died only at 2 or 3 weeks. Furthermore, the IFN- γ , IL-10, IL-17 and TNF- α production were measured in the supernatant from spleen cell culture *in vitro* when the cells were stimulated with alive *B. abortus* (S2308), heat killed *B. abortus* (HKBa), *E. coli* LPS or ConA. IL-10 KO cells showed greater increase in IFN- γ and TNF- α level in the supernatant from these cells when they were stimulated with *Brucella* when compared to wild type cells production. IL-17 was only detected in the supernatant from IL-10 KO cells in all time points analyzed. In addition, the TNF- α , IL-6, IL-12-p40, NO and IL-10 levels were evaluated in bone-marrow macrophage derived cell supernatant. TNF- α , NO, IL-6 and IL-12 showed augmented in IL-10 KO cells when stimulated with HKBa. However, only in supernatant from 129 Sv/Ev mice it was observed IL-10 production. In bone-marrow dendritic cell supernatant greater levels of TNF- α and IL-12-p40 were observed in IL-10 KO cells when compared to wild type mice cells during all time points analyzed when the cells were stimulated with all stimulus. The *TGF- β* expression was evaluated by real time PCR in splenic cells culture at 0 (non-infected cells), 1, 2 and 6 weeks after infection with S2308. At 2 weeks post infection the IL-10 KO cells demonstrated greater increased of *TGF- β* expression when compared to

wild type cells. At 6 weeks post infection the *TGF-β* expression profile showed inverted. Additionally, the level of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) cells was assessed at spleen of infected mice by flow cytometry during the infection process. This population was increased at 3th and 6th weeks post infection in IL-10 KO mice. Descriptive histopathology analyses were done at liver level demonstrating a gradual diminishment of granuloma in both kinds of analyzed animals. However, the decrease pathology was more effective at IL-10 KO livers considering the granuloma area, measured by digital morphometry, and the hepatic parenchyma recovery. Taken together, the data provided by this work support that the lack of IL-10 is related to higher resistance to *B. abortus* infection in murine infection throughout the increase production of pro-inflammatory cytokines culminating with better bacteria elimination and a quicker tissue pathological resolution leading to a more effective control of this infection.

KEYWORDS: IL-10 KO, *Brucella abortus*, Immune Modulation

ÍNDICES DE FIGURAS

- Figura 1:** Aspecto das colônias de *Brucella abortus*, cepa S2308, com 3 dias de crescimento em meio *Brucella* Broth (BB), (DIFCO), solidificado em ágar. Fonte: Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, UFMG.....10
- Figura 2:** Tempo de sobrevivência da *Brucella abortus* no ambiente. Fonte: BRASIL, 2006.....11
- Figura 3:** Representação esquemática do LPS de *Brucella*. Fonte: Adaptado de CARDOSO *et al.*, 2006.....12
- Figura 4:** Incidência mundial da Brucelose humana. [http/ infection.thelancet.com](http://infection.thelancet.com) vol 6 February 2006.....13
- Figura 5:** Órgãos do corpo humano afetados pela *Brucella*. Fonte: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch028.htm>.....16
- Figura 6:** (A): Localização dos linfonodos. (B): Localização dos cotilédones. Fonte: adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>, 2003...16
- Figura 7:** Tráfego intracelular da bactéria no macrófago. Fonte: CELLI, 2005.....18
- Figura 8:** TLRs de mamíferos: especificidades, mecanismos básicos de sinalização e respostas celulares. Fonte: ABBAS *et al.*, 2008.....23
- Figura 9:** Sinalização celular via TLRs e IFN- $\alpha\beta$ R em resposta à infecção por *Brucella*. Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2008.....24
- Figura 10:** Estrutura tridimensional da IL-10 e do IL-10R. Fonte: <http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2004/issue231/images/large/2312004re7F8.jpeg>.....30
- Figura 11:** Característica fenotípica de uma célula Treg. Rev. Bras.Reumatol, v 48 n 6 p 342-355 nov/dez, 2008.....33

Figura 12: Expressão da IL-10 pelas células T. Nature Immunology Review, 2010.....	34
Figura 13: Indução de células Treg produtoras de IL-10 pela ação do TGF- β . Nature Immunology Review, 2010.....	34
Figura 14: Produção de IL-12-p40 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e NO (D) por macrófagos derivados da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129Sv/Ev	52
Figura 15: Produção de IL-10 (A) por macrófagos derivados da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129Sv/Ev.....	54
Figura 16: Produção de IL-12-p40 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) por dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129Sv/Ev.....	57
Figura 17: Produção de IL-10 (A) por dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev.....	59
Figura 18: Camundongos IL-10 KO tem um aumento na capacidade de controlar a infecção por <i>Brucella abortus</i> em todos os tempos de infecção.....	60
Figura 19: Curva de sobrevivência dos camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev (A) e porcentagem de sobrevivência entre machos e fêmeas (B).....	62
Figura 20: Produção de TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-17 (C) de esplenócitos dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO.....	67
Figura 21: Células T helper (Th) concomitantes com Th1, Th17 e Treg, Juntamente com a produção de TGF- β por Treg na indução fenotípica Th17. Clinical and Experimental Immunology, 2007.....	68
Figura 22: Produção de TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-17 (C) de esplenócitos dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO.....	69
Figura 23: Produção de IL-10 (A) de esplenócitos dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO.....	71
Figura 24: Curva de dissociação (A) e produção de TGF- β (B) da cultura de esplenócitos de camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO.....	73

Figura 25: Delineamento experimental da análise de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ por citometria de fluxo (A) e avaliação da razão na produção de células Treg induzida por Treg naturais (B) em camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO.....	77
Figura 26: Análise histopatológica do Fígado dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO (A) e imagens das lâminas (objetiva de 40x) referentes aos mesmos animais...	82
Figura 27: Morfometria digital para análise da área do granuloma do fígado de camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev.....	84
Figura 28: Imunohistoquímica para marcar a <i>B. abortus</i> dentro das limitações dos granulomas em camundongos 129 Sv/Ev (A) e IL-10 KO (B).....	87
Figura 29: Modelo proposto de regulação do sistema imune na ausência IL-10 no combate efetivo da infecção causada pela bactéria <i>B. abortus</i>	88

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1: Concentração dos estímulos utilizados.....	37
Tabela 2: Marcações analisadas na população de esplenócitos.....	42
Tabela 3. Seqüência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – célula apresentadora de antígeno
BB - meio de cultura Brucella Broth
BCV – Brucella containing vacúolo
BMMø – Macrófagos derivados de medula óssea
°C – graus Celsius
DMSO: dimetil sulfóxido
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA - Ácido desoxirribonucléico
EDTA: ácido etilenodiamino tetracético
ELISA- ensaio de absorção imunoenzimático
EUA: Estados Unidos da América
FACS – do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorting*
FITC – isotiocinato de fluoresceína
g – unidade de força centrífuga relativa
HBSS – do inglês *Hank's Balanced Salt Solution*
HKBA – *Brucella abortus* inativada pelo calor
IL-2: interleucina 2
IL-6: interleucina 6
IL-10: interleucina 10
IL- 12 p 40- subunidade 40 da interleucina 12
IL-17: interleucina 17
IFN- γ interferon gama
IL-10 KO Nocaute para interleucina 10
IRF- fator regulador de interferon
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
IRF – fator regulador do interferon
iTreg Células T reguladore induzida
Kb – quilobase
LAMP-1 - proteína de membrana associada ao lisossomo 1
LPS – lipopolissacarídeo
LCCM – do inglês L929 *cell conditioned medium*
mg – miligramas
MAPK – proteínas quinases ativadas por mitógeno
M-CSF – fator estimulador de colônias de monócitos
MHC – complexo de histocompatibilidade principal
mL – mililitro
MOI – multiplicidade de infecção
MyD88 – fator de diferenciação mielóide 88
MyD88^{-/-} – deficiência do fator de diferenciação mielóide 88
mM – milimolar
ng – nanograma
NF- κ B – fator nuclear κ B
NK – do inglês *natural killer*
NO – óxido nítrico
NOS2 – óxido nítrico sintase 2
N-terminal – amino-terminal
nTreg Célula T reguladora natural

OMS: Organização Mundial de Saúde
pb – pares de bases
pg – picograma
pmol – picomol
PAMP – padrão molecular associado à patógeno
PBS – tampão salina fosfato
PE – ficoeritrina
PCR - reação em cadeia da polimerase
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa
Rpm – rotações por minuto T
SFB – soro fetal bovino
TLR – Receptor do tipo Toll
TNF- α fator de necrose tumoral alfa
TAK – quinase ativada por TGF- β
Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*
Th1 – T *helper* 1
TIR – região homóloga de receptors Toll/IL-1-receptor
Treg Células T reguladora
TGF- β - Fator de crescimento transformador- β
U – unidade
UFC – unidade formadora de colônia
 μ g - micrograma
 μ L – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Histórico.....	9
2.2 Caracterização da bactéria.....	9
2.3 Prevalências.....	13
2.4 Patogênese e fatores de virulência.....	14
2.5 Sinais clínicos e prevenção.....	19
3 IMUNIDADE.....	22
3.1 Inata.....	22
3.2 Adquirida.....	26
4 IL-10.....	29
5 OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
6.1 Modelo animal.....	37
6.2 Cepas bacterianas.....	37
6.3 Condições de cultivo bacteriano.....	37
6.4 Extrações, cultivos e diferenciações de macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea.....	38
6.5 Infecção “in vivo”.....	40

6.5.1 Determinação da UFC.....	41
6.5.2 Curva de sobrevivência.....	41
6.5.3 Cultura e estimulação de esplenócitos.....	41
6.5.4 Dosagem de citocinas.....	42
6.5.5 Dosagem de óxido nítrico (NO).....	42
6.6 Análises da produção de CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ por citometria de fluxo.....	43
6.7 Análises de expressão diferencial de genes por pcr em tempo real.....	44
6.7.1 Extração de RNA.....	44
6.7.2 PCR em tempo real.....	45
6.8 Análises histopatológicas e imunohistoquímica.....	46
6.9 Análises da área dos granulomas por morfometria digital.....	47
6.10 Análises estatísticas.....	49
7 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	50
7.1 <i>Brucella abortus</i> morta pelo calor (HKBA) induz maior produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos derivados da medula óssea (BMM ϕ) de animais IL-10 KO.....	50
7.2 <i>Brucella abortus</i> induz a produção de citocina antiinflamatória (IL-10) em macrófagos derivados da medula óssea (BMM ϕ) de camundongos selvagens 129 Sv/Ev.....	54
7.3 Células dendríticas provenientes de camundongos IL-10 KO estimulados pela <i>Brucella</i> produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias.....	56
7.4 <i>Brucella abortus</i> gera a produção de IL-10 em células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos selvagens 129 Sv/Ev.....	58

7.5 Os camundongos IL-10 knockout são mais resistentes à infecção por <i>Brucella abortus</i>	60
7.6 Camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev sobrevivem a infecção pela bactéria <i>B. abortus</i>	61
7.7 Esplenócitos de camundongos IL-10 KO infectados pela <i>B. abortus</i> culminam com alta secreção de citocinas pró-inflamatórias.....	63
7.8 <i>B. abortus</i> tem a capacidade de produzir IL-10 em animais 129 Sv/Ev durante todas as semanas analisadas.....	69
7.9 <i>Brucella abortus</i> induz a expressão de <i>TGF-β</i> <i>in vitro</i>	72
7.10 <i>B. abortus</i> leva ao aumento na produção de iTreg nos animais IL-10 KO.....	75
7.11 Camundongos IL-10 KO apresentam melhor capacidade de controlar a infecção pela <i>B. abortus</i>	80
7.12 Camundongos IL-10 KO apresentam menor área de granuloma.....	84
7.13 <i>B. abortus</i> evidenciada nos granulomas hepáticos.....	86
8 CONCLUSÃO	90
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1- INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Brucella* apresentam grande importância econômica e de saúde pública, visto que tornam os produtos derivados do leite e carne vulneráveis as barreiras sanitárias no mercado internacional, causando prejuízos de cerca de 32 milhões de dólares ao ano para a economia brasileira (POESTER *et al.*, 2002). Há espécies significativamente antropozoonóticas, de grande prevalência em algumas regiões.

Devido ao caráter zoonótico, a *Brucella abortus* é a mais difundida no mundo. A Brucelose bovina provoca uma redução de 20 a 25% na produção leiteira, abortos em fêmeas gestantes, esterilidade temporária e perda de peso, além da condenação de carcaças na inspeção, ocorrendo uma desvalorização da carne (SOUZA, 1977). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de casos de brucelose bovina no Brasil cresceu de 13.000 casos em 2000, para aproximadamente 80.000 em 2004. Essa mesma fonte relatou que a cada ano são diagnosticados 500 mil novos casos de brucelose humana no mundo.

O Brasil possui o maior rebanho de bovinos comercial do mundo, sendo assim obrigatória à notificação dos casos de brucelose bovina e bubalina, por médicos veterinários habilitados, de acordo com o art. 5º do Decreto 5.741/2006 que regulamenta o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) e a IN 30/2006 (BRASIL, 2006).

Desvendar o curso de uma infecção e o mecanismo de ação do sistema imunológico representa um importante passo para o seu controle. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da Interleucina-10 (IL-10) endógena, na infecção pela *Brucella abortus* em modelo murino. Esse trabalho possibilita ampliar o conhecimento da rede de modulação e regulação da resposta imune, contra essa bactéria intracelular.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- HISTÓRICO

Historicamente, a brucelose é uma antropozoonose conhecida desde épocas remotas. Há registros de que Hipócrates, em 460 A.C., fazia referência a pacientes com sintomas compatíveis com a brucelose. Pesquisas recentes, realizadas na Itália, revelaram que esqueletos remanescentes de pessoas que sucumbiram a catástrofe do vulcão Vesúvio, na cidade de Herculano, ocorrida no ano 79 da era cristã, apresentavam lesões típicas de brucelose. Uma provável explicação foi proporcionada pela microscopia eletrônica que revelou a presença de cocobacilos compatíveis com *Brucella* em queijos elaborados com leite de cabras e que foram encontrados carbonizados em escavações naquela cidade italiana (CAPASSO, 2002).

Em 1887, David Bruce, isolou o agente *Micrococcus melitensis*, responsável pela febre de malta de soldados britânicos mortos, em consequência dessa enfermidade na Ilha de Malta, localizada no Mediterrâneo, não muito distante da extinta cidade de Herculano (GOLDFROID *et al.*, 2005). Em 1895, o patologista veterinário dinamarquês L. F. Bernhard Bang isolou uma bactéria de fetos abortados de bovinos, denominada *Bacillus abortus* e identificou o agente etiológico do aborto enzoótico dos bovinos (NICOLETTI, 2002). Esses microrganismos foram posteriormente, renomeados como *Brucella melitensis*, em homenagem ao seu descobridor, David Bruce (LEÓN, 1994).

2.2- CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA

O gênero *Brucella* é constituído por pequenos cocobacilos, Gram-negativos, intracelulares facultativos, sem motilidade, sem flagelos, que não secretam toxinas (CRAWFORD *et al.*, 1990). Não são capazes de se encapsular e nem de esporular (CORBEL e MORGAN, 1984). Pertencem à família α 2-protobacteriacea, composta por uma diversidade de bactérias que variam desde

espécies simbióticas, até patógenos extracelulares como *Agrobacterium tumefaciens*, ou intracelulares obrigatórios como *Rickettsia* sp. (TSOLIS, 2002).

Classificação filogenética da bactéria *Brucella*

Reino: Bactéria

Filo: Proteobacteria

Classe: Alpha-2-Proteobacteria

Ordem: Rhizobiales

Família: Brucellaceae

Gênero: *Brucella*

Espécies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pennipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata* e outra espécie ainda sem classificação, isolada de babuíños.

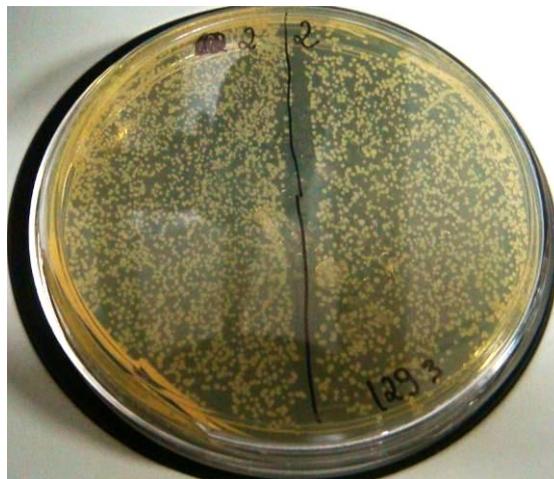


Figura 1: Aspecto das colônias de *Brucella abortus*, cepa S2308, com 3 dias de crescimento em meio *Brucella* Broth (BB), (DIFCO), solidificado em ágar. Fonte: Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, UFMG.

O crescimento é aeróbio, mas algumas espécies necessitam de uma atmosfera com adição de 5 a 10% de CO₂. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C, em meio rico, com pH entre 6,6 a 7,4. As colônias são visíveis em meio sólido entre 2 a 3 dias (Figura 1), podendo apresentar-se sob a forma lisa ou

rugosa, dependendo da cepa bacteriana, medindo entre 3 a 4 mm de diâmetro (ALTON *et al.*, 1988). As bactérias são muito resistentes às intempéries ambientais (Figura 2) e podem sobreviver a grandes períodos no meio ambiente (CRAWFORD *et al.*, 1990).

Ambiente	sobrevivência
Luz solar direta	4 – 5 horas
Solo seco	4 dias
Solo úmido	66 dias
Solo a baixas temperaturas	151 – 185 dias
Fezes	120 dias
Esgoto	8 – 240 / 700 dias
Esgoto altas temperaturas	4 horas – 2 dias
Água potável	5 – 114 dias
Água poluída	30 – 150 dias
Feto à sombra	180 dias
Exsudato uterino	200 dias

Figura 2: Tempo de sobrevivência da *Brucella abortus* no ambiente. Fonte: BRASIL, 2006.

Essa bactéria, como as outras Gram-negativas, possui uma membrana celular externa composta de lipopolissacarídeos (LPS), que é considerado um dos principais fatores de virulência deste gênero (KELLY *et al.*, 1990).

O LPS é constituído pelo lipídio A, uma camada de oligossacarídeos e uma cadeia O distal de polissacarídeos (Figura 3). Enquanto as espécies *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* possuem morfologia lisa com todas as camadas intactas, *B. ovis* e *B. canis* são espécies naturalmente rugosas, uma vez que não possuem a cadeia O (GODFROID *et al.*, 2000).

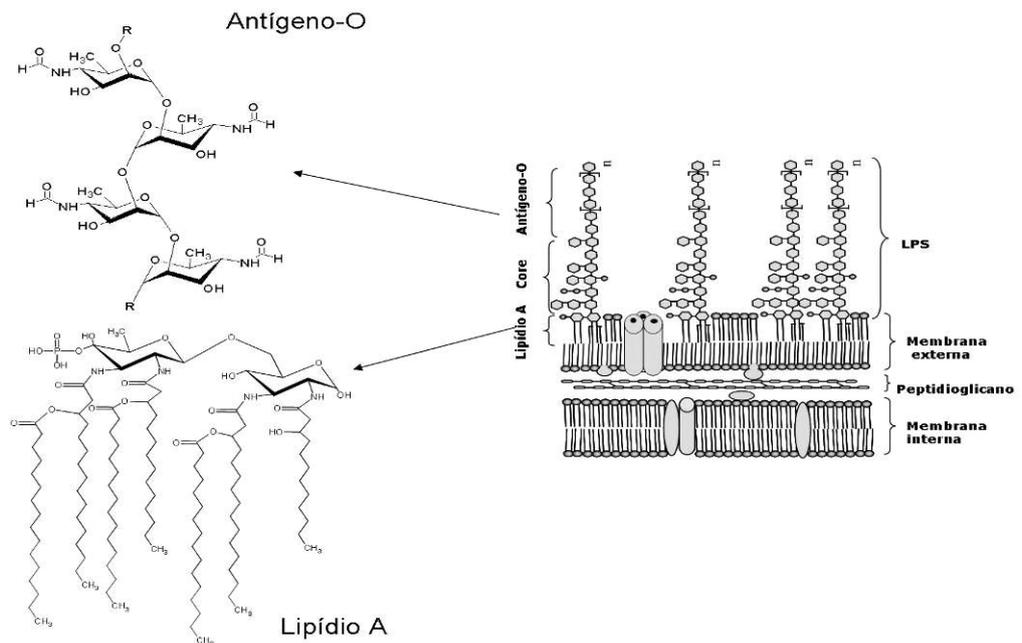


Figura 3: Representação esquemática do LPS de *Brucella*. Fonte: Adaptado de CARDOSO *et al.*, 2006.

Considerando as diferenças na patogenicidade, nas características bioquímicas e nos hospedeiros preferenciais, as seis espécies mais comuns pertencentes ao gênero *Brucella* são: *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. suis* (suínos), *B. abortus* (bovinos), *B. ovis* (ovino), *B. canis* (caninos), *B. neotomae* (ratos do deserto). Com exceção de *B. ovis* e *B. neotomae*, as demais espécies clássicas de *Brucella* são consideradas patogênicas para o homem (GODFROID *et al.*, 2005). Segundo Poester *et al.* (2002), *B. melitensis* não foi isolada no Brasil, porém é considerada a mais virulenta para o homem, sendo necessária uma pequena quantidade para a instalação de uma infecção crônica (ALTON, 1990).

Além das seis espécies descritas foram isoladas cepas de *Brucella* de mamíferos marinhos, classificados como *B. maris* (JAHANS *et al.*, 1997). Contudo, foi proposto posteriormente uma nova classificação, sendo identificadas como *B. pinnipedialis* e *B. ceti*, as cepas isoladas de focas e cetáceos, respectivamente (FOSTER *et al.*, 2007). Os isolados marinhos também possuem potencial zoonótico, com relato de infecção acidental em laboratório (BREW *et*

al., 1997) e dois casos de pacientes naturalmente infectados que apresentaram sinais neurológicos (SOHN *et al.*, 2003).

Recentemente, foram identificadas três novas espécies de *Brucella*: *B. microti* descrita em roedores (SCHOLZ *et al.*, 2008), *B. inopinata* isolada de implante mamário em uma mulher (DE *et al.*, 2008; SCHOLZ *et al.*, 2009). Além disso, uma nova espécie foi isolada do útero de babuínos, associada ao aborto e que permanece sem classificação definitiva (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH *et al.*, 2009).

Apesar de grandes controvérsias quanto à taxonomia do gênero *Brucella*, técnicas avançadas de genotipagem têm possibilitado identificar polimorfismos no DNA entre as espécies de *Brucella* (HALLING *et al.*, 2005; FOSTER *et al.*, 2009), favorecendo que a atual classificação taxonômica seja mantida (MORENO *et al.*, 2002; XAVIER *et al.*, 2009).

O bovino é o hospedeiro preferencial da *B. abortus*, que também pode ser transmitida para búfalos, camelos, veados, cães, cavalos, cabras, ovelhas e o homem (KUDI *et al.*, 1997). No Brasil a brucelose bovina devido a *B. abortus* é a mais prevalente infecção pela *Brucella* (POESTER *et al.*, 2002).

2.3- PREVALÊNCIA

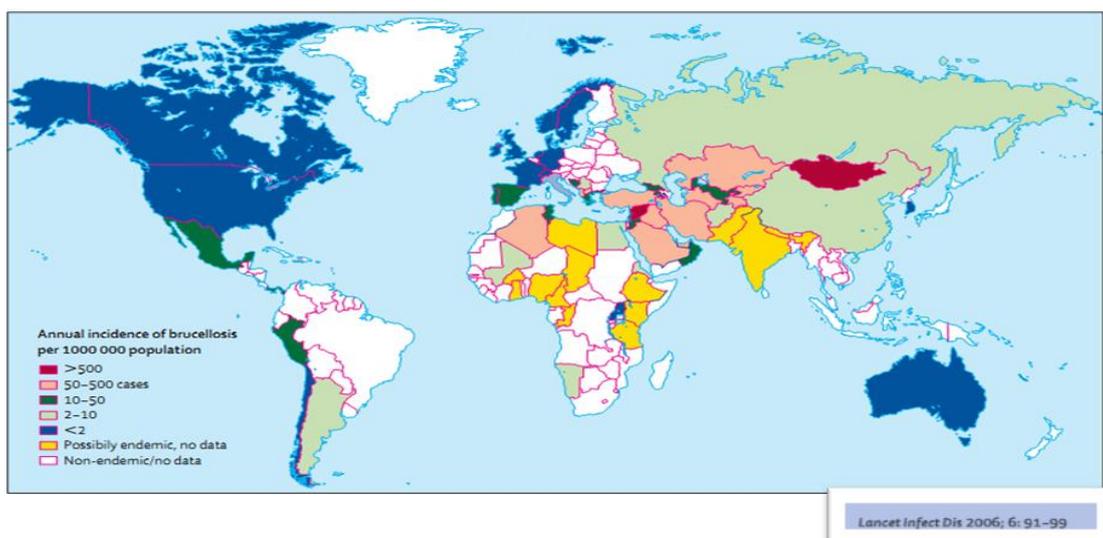


Figura 4: Incidência mundial da Brucelose humana. <http://infection.thelancet.com> vol 6 February 2006.

O Brasil é detentor do segundo maior rebanho bovino do mundo, perdendo apenas para a Índia, sendo o maior rebanho comercial e o maior produtor de carne (USDA, 2007). Encontram-se dispersos por todo o Território Nacional, embora haja maior concentração na região centro-oeste do país. Na pecuária leiteira, Minas Gerais destaca-se como o principal produtor, com participação de 27,8% da produção total do país (IBGE, 2008). Goiás destaca-se como um dos mais importantes estados na produção de carne e é o segundo na produção de leite (ANUALPEC, 2003). O rebanho brasileiro é totalizado em aproximadamente 207 milhões de cabeças (IBGE, 2007).

A Brucelose tem distribuição heterogênea entre os Estados do Brasil, (Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009). Em Minas Gerais observou-se 1,1% de animais soropositivos. No Mato Grosso do Sul tem aumentado a prevalência de focos desde 1980 a 1990, porém existe uma situação de relativo equilíbrio. Os percentuais de animais soropositivos apresentam-se variados nos demais Estados como: Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Tocantins, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Sergipe e São Paulo, sendo que o maior valor encontrado foi de 10,2% em Mato Grosso.

Esta patologia acomete principalmente países do Mediterrâneo, Ásia Central, Península Arábica, Índia e América Latina (Figura 4), (HARTIGAN, 1997; FRANCO *et al*, 2007). O México é endêmico para a Brucelose e nesse país existe a presença da *B. melitensis* que é a mais patogênica para o homem (LUNA-MARTINEZ e MEJÍA-TERAN, 2002). No Paraguai desde 1979 a 2000, o número de casos permaneceu constante, entre 3 a 4% (BAUMGARTEN, 2002). Na Argentina estudos têm demonstrado que a brucelose está presente na maioria das espécies domésticas e as estimativas indicam perda anual de 60 milhões de dólares (SAMARTINO, 2002).

2.4- PATOGÊNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA

A infecção ocorre através da pele, conjuntiva, mucosa respiratória ou digestiva (CRAWFORD *et al.*, 1990; KO e SPLITTER, 2003). O trato

gastrointestinal é a via mais comum de infecção em bovinos, sendo distribuída para os linfonodos locais, onde ocorre a replicação dentro dos fagócitos intracelulares (ANDERSON *et al.*, 1986). A invasão dos vasos linfáticos é caracterizada pela bacteremia, levando a uma infecção sistêmica, favorecendo a colonização no útero gravídico, órgãos genitais masculinos e glândula mamária (KO e SPLITTER, 2003). Depois da penetração e transporte da bactéria ocorrem inflamação e hiperplasia nos linfonodos regionais. A multiplicação e disseminação para o linfonodo, baço e fígado (Figura 5) ocorre via linfa e pela corrente sangüínea (ALTON e FORSYTH, 1999).

A *Brucella* tem a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas (JONES e WINTER, 1992) e não fagocíticas (DETILLEUX *et al.*, 1990). Contudo, os macrófagos (CORBEL *et al.*, 1997) e os trofoblastos (CARVALHO NETA *et al.*, 2008) são considerados como as principais células de resistência do hospedeiro para esse patógeno.

B. abortus tem um forte tropismo pelo útero durante o último trimestre da gestação, o qual ocorre devido às altas concentrações de eritritol e hormônios esteróides. Acredita-se que os produtos da degradação desses hormônios (prostaglandina e estradiol), sejam utilizados no metabolismo da *Brucella* (SMITH *et al.*, 1961; MEADOR; DEYOE, 1989). O eritritol favorece a sobrevivência da bactéria, sendo metabolizado como uma fonte de carbono e energia (SAMARTINO e ENRIGHT, 1996). Esse metabólito está presente no útero gravídico, tecidos mamários, ósteo-articulares e órgãos do sistema reprodutivo masculino como: testículo, epidídimo e vesícula seminal (OMS, 1986).

A multiplicação da *Brucella abortus* no útero desencadeia uma reação inflamatória dos placentomas que evolui para necrose, lise das vilosidades e subsequente deslocamento do cotilédone e da carúncula (Figura 6). No curso agudo, esse processo desencadeia o abortamento (PAULIN, 2006). A bactéria é eliminada pelo animal infectado, pelos produtos do abortamento ou parto e pela secreção vaginal, durante todo o puerpério. O agente no leite é eliminado e persiste por meses (ACHA; SZIFRES, 2001).

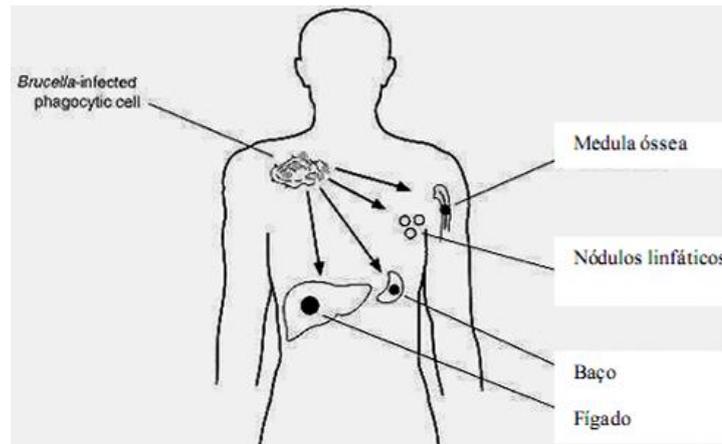


Figura 5: Órgãos do corpo humano afetados pela *Brucella*. Fonte: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch028.htm>

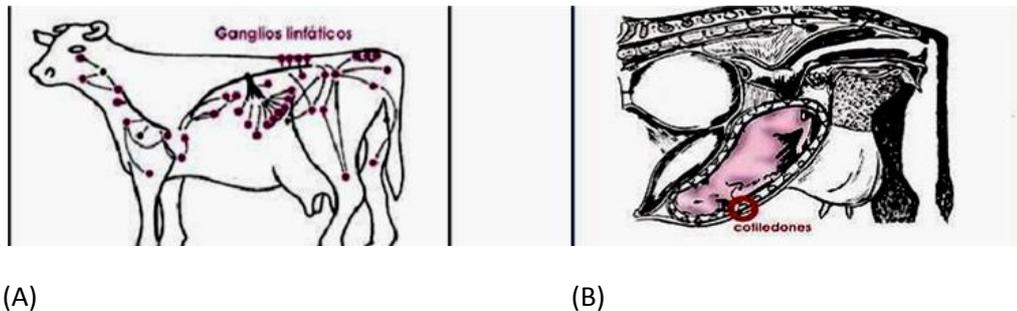


Figura 6: (A): Localização dos linfonodos. (B): Localização dos cotilédones. Fonte: adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/miquinan/apc100/modules/reproductive>, 2003.

Brucella não possui fatores de virulência clássicos como citolisinas, cápsulas, fimbrias ou flagelos. A infecção por bactérias intracelulares requer uma significativa interação entre o hospedeiro e o patógeno que é feita em quatro passos fundamentais: aderência, invasão, estabelecimento e disseminação (ESKRA *et al.*, 2001). A internalização e o tráfego são eventos distintos que envolvem mecanismos moleculares bacterianos específicos de cada fase. Sendo assim, a capacidade de modular a expressão gênica para adaptar-se ao meio intracelular é o componente chave da virulência bacteriana. Vários mecanismos têm sido propostos como contribuinte para a sobrevivência da *B. abortus* no interior das células fagocíticas do hospedeiro, como: a produção de enzimas que protegem a bactéria da destruição oxidativa; a produção de enzimas que impedem a fusão fagossomo/lisossomo; e a secreção de 5'-guanosina

monofosfato (GMP) e adenosina, inibindo a ação bactericida da mieloperoxidase – H_2O_2 . Foram identificados vários fatores patogênicos que são determinantes para a invasão e a sobrevivência intracelular da *Brucella*, tais como: lipopolisacarídeos (LPS), sistema de dois componentes BvrR:BvrS, sistema de secreção do tipo IV e sistema transportador ABC (GORVEL e MORENO, 2002; LÓPEZ-GOÑI *et al.*, 2002; ROSINHA *et al.*, 2002; LAPAQUE *et al.*, 2005).

O LPS da *Brucella* tem baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação por mecanismos bactericidas dos macrófagos. Juntas, estas características são importantes na virulência e sobrevivência intracelular da *Brucella*. As cepas lisas da *Brucella* entram na célula hospedeira através de microdomínios de lipídios, também conhecido como “lipid rafts”, existentes na membrana desta célula. Através deste mecanismo, o patógeno evita a fusão fagossomo/lisossomo. Este mecanismo parece ser importante na sobrevivência da bactéria em macrófagos infectados, já que as células com os microdomínios estruturalmente alterados por substâncias químicas são capazes de eliminar todas as bactérias fagocitadas (MARIA-PILAR *et al.*, 2005). De particular interesse, presentes nos “Lipid rafts” são os receptores do tipo “Scavenger”. Acredita-se que parte da complexa interação que ocorre durante a infecção, entre as membranas do patógeno e o hospedeiro seja mediada por ligações entre o lipídio-A, componente do LPS da membrana externa da bactéria e os receptores “Scavenger” do tipo A (SR-A), (LAPAQUE *et al.*, 2005). Depois de entrar na célula hospedeira, a *Brucella* é capaz de resistir a peptidases lisossomais devido ao seu LPS. Para sobreviver e multiplicar nas células hospedeiras, a bactéria ativa vários genes e secretam proteínas que facilitam a adaptação da bactéria no interior do macrófago.

Um dos principais fatores de virulência para a sobrevivência e replicação intracelular da *Brucella* é o sistema de secreção do tipo IV (SST4), codificado pelo operon *virB* que é composto por 12 genes. O gene *virB12* foi identificado somente em bactérias do gênero *Brucella* (O'CALLAGHAN *et al.*, 1999). Neste gênero, o SST4 possivelmente não está envolvido na translocação de DNA, mas de proteínas efetoras importantes para a manutenção intracelular do organismo no hospedeiro (BOSCHIROLI *et al.*, 2002; DE JONG *et al.*, 2008). O SST4 é essencial para o estabelecimento de infecção persistente, pois altera a maturação do vacúolo contendo a *Brucella* e inibe a sua fusão com o lisossomo,

permitindo que o organismo alcance o retículo endoplasmático (Figura 7) e se replique intracelularmente em células fagocíticas profissionais e não fagocíticas (HONG *et al.*, 2000; SIEIRA *et al.*, 2000; COMERCI *et al.*, 2001; CELLI *et al.*, 2003).

O sistema regulatório de dois componentes BvrR:BvrS de *Brucella* regula a expressão de genes que codificam proteínas externas de membrana (OMP), que estão relacionadas com a invasão celular do organismo. Este sistema é importante para a sobrevivência intracelular, uma vez que os mutantes não conseguem escapar da fusão fago-lisossomo (GUZMAN e VERRI *et al.*, 2002; LÓPEZ-GOÑI *et al.*, 2002).

Outro fator é o sistema do tipo ABC (“ATP binding cassette”). Transportadores ABC são capazes de importar peptídeos, poliaminas, íons, aminoácidos, ferro e sulfatos para o interior da bactéria e exportar antibióticos, ácidos graxos e toxinas, além de possuir importante papel na manutenção da expressão gênica e reparo de DNA (TAM e SAIER, 1993).

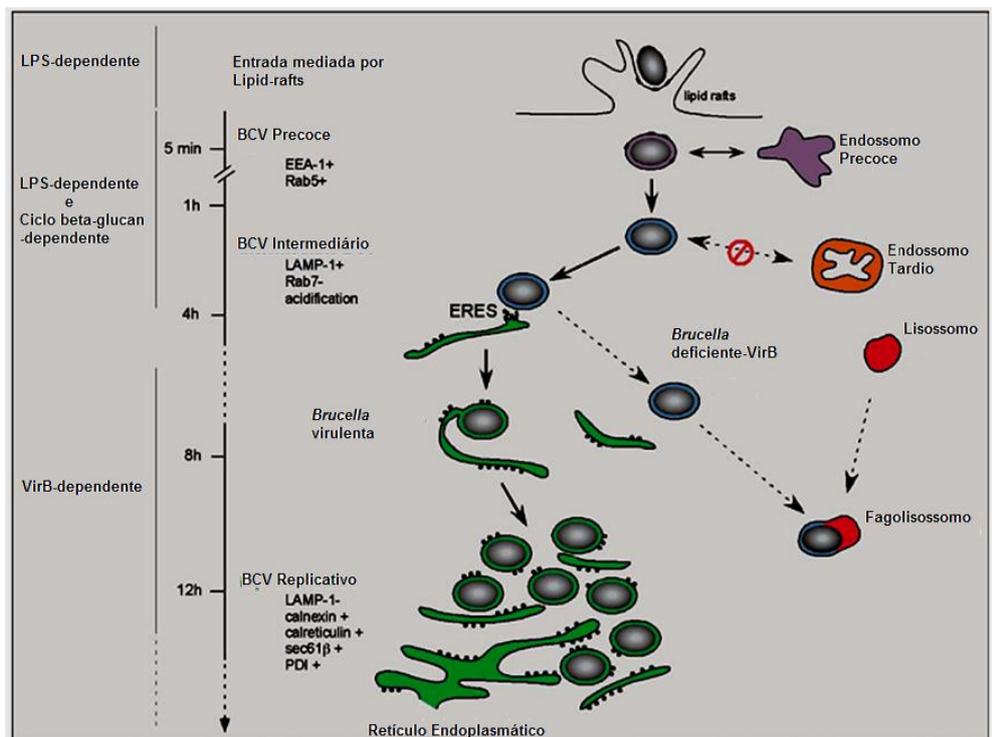


Figura 7: Tráfego intracelular da bactéria no macrófago. Fonte: CELLI, 2005.

2.5- SINAIS CLÍNICOS E PREVENÇÃO

A brucelose humana não apresenta sintoma clínico específico. Frequentemente está associado com febre intermitente, anorexia, poliartrites meningites, pneumonia, endocardites e outras manifestações clínicas menos comuns (SAURET e VILISSOVA, 2002). Os pacientes normalmente se infectam por contatos diretos com produtos de abortos ou pela ingestão da bactéria em alimentos, geralmente derivados lácteos não pasteurizados (queijos, manteigas, iogurtes e sorvetes). Nos laboratórios e abatedouros, a bactéria é geralmente transmitida sob a forma de aerossóis. A carne não é uma fonte importante de transmissão da bactéria, a não ser quando estiver pouco cozida ou mal assada. O contato com culturas de laboratório, com amostras de tecidos contaminados e a injeção acidental de vacinas vivas são importantes fontes de infecção para humanos. A transmissão entre pessoas, embora possível, é um acontecimento raro em brucelose. Há casos na literatura de transmissão, por meio de transfusão de sangue, transplante de medula e até por relação sexual (BRASIL, 2004).

No animal, a manifestação clínica da brucelose bovina, depende da idade, reprodução, estado imunológico, via de infecção, virulência e dose (ADAMS, 2002). Clinicamente, o aborto no terço final da gestação é o sinal mais importante. Em casos de brucelose endêmica no rebanho, a vaca infectada aborta apenas uma vez e as lactações subseqüentes parecem normais. Ocorrem também repetições de cios, retenção de placenta, infecções intrauterinas, metrites, diminuição da produção do leite, aumento da contagem de células somáticas no leite e períodos de esterilidade temporária. As gestações futuras podem apresentar nascimento de bezerros sadios ou doentes (fracos). Algumas vacas infectadas podem não apresentar sintomas clínicos gerando bezerros normais. A transmissão ocorre após o aborto ou o parto de vacas infectadas, via fetos contaminados, membranas fetais e secreções uterinas (SILVA *et al.*, 2005).

Os machos infectados pela *B. abortus* podem não apresentar a doença, porém é comum a manifestação de orquites, associado com vesiculites e epididimites. A infecção pode resultar em infertilidade temporária ou permanente, dependendo da intensidade da lesão (SILVA *et al.*, 2005). Ressalta-se a importância do cuidado no emprego da inseminação artificial, pois o sêmen é

aplicado diretamente no útero, onde é o ambiente propício para a multiplicação da bactéria.

De acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) são aceitos como testes sorológicos oficiais, o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o teste do Anel em Leite (TAL), como testes de triagem. Os soros com resultados positivos no AAT, devem ser submetidos aos testes confirmatórios do 2-Mercaptoetanol (2ME) e/ou Fixação do Complemento (FC). Utilizam-se métodos bacteriológicos realizados em cultura de sangue ou tecidos de animais e indivíduos infectados. Testes sorológicos baseados na reação antígeno-anticorpo também são aplicados como ELISA (Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima) e de soro-aglutinação (ALTON *et al.*, 1988).

A vacinação é um método de prevenção largamente utilizada para controle de uma doença. O ideal de uma vacina viva, a qual tem demonstrado ser mais eficiente que a morta, seria não provocar doença nos animais vacinados, prevenir a infecção em ambos os sexos, prevenir o aborto e esterilidade, promover proteção por um longo tempo em pequenas doses, não interferir no diagnóstico, ser estável, não apresentar riscos de reversão da virulência, não ser patogênica ao homem e ser facilmente produzida em larga escala (WHO, 1998).

Atualmente a vacinação contra brucelose é feita através da administração das linhagens lisas atenuadas S19 da *B. abortus* e REV1 da *B. melitensis*. Existe também a linhagem rugosa, RB51, que foi introduzida em países como EUA, Chile e Canadá (WHO, 1998). Porém a S19 é virulenta ao homem, induz aborto quando administrada em fêmeas gestantes e a presença do seu LPS liso interfere na discriminação entre animais infectados e vacinados. A RB51, cepa rugosa estável obtida de passagens sucessivas da cepa S2308, em meios de cultura com Rifampicina, é avirulenta em camundongos e bovinos, mantém a capacidade de induzir proteção em altas doses e não interfere no diagnóstico, contudo é resistente a Rifampicina que é o antibiótico de escolha para o tratamento da brucelose humana.

Segundo o Programa Nacional de controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose no Brasil, bezerras entre 3-8 meses de idade vacinadas com a S19 apresentam boa titulação de anticorpos, nos testes sorológicos. Foi recentemente

aprovada a vacinação pela RB51 de vacas adultas, não vacinadas quando bezerras, a fim de abreviar o tempo necessário, para a obtenção de altas coberturas vacinais na população de fêmeas em idade de procriar. Vale salientar que a vacinação enquanto bezerras é obrigatória. O objetivo do programa é atingir uma alta cobertura vacinal de fêmeas (80% do rebanho), por meio da vacinação de bezerras, de forma a reduzir a prevalência de brucelose para níveis que permitam passar à fase de erradicação (BRASIL, 2006).

3- IMUNIDADE

3.1- IMUNIDADE INATA

A primeira linha de defesa do sistema imune do hospedeiro inicia-se com o reconhecimento dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), das células do sistema imune inato, pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Este reconhecimento ativa a via de sinalização intracelular que culmina com a indução de citocinas inflamatórias, quimiocinas, Interferons (IFNs) e regulação positiva de moléculas co-estimulatórias (KAWAI *et al.*, 2007). Há várias classes distintas de PRRs, sendo melhor caracterizados os receptores do tipo Toll (TLRs). NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) é outro PRR que contém subfamílias NOD1 e NOD2, os quais são receptores da imunidade inata envolvidos na detecção de bactérias intracelulares, através do reconhecimento de estruturas distintas de fragmentos peptídeo-glicanos (MEDZHITOV, 2007; BOURHIS *et al.*, 2007).

A ligação destes PAMPs à seus receptores disparam sinais que ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs) e facilitam a fagocitose da bactéria (AKIRA *et al.*, 2006). Esta reação inicial não é antígeno ou organismo-específico e é referida como imunidade inata (GOLDING *et al.*, 2001). O reconhecimento inicial da *Brucella* por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs) envolvem receptores do tipo Toll (TLRs). Esta etapa de identificação da *Brucella abortus* por células dendríticas (DCs) é crucial para o estabelecimento de uma resposta imune eficiente.

Os receptores do tipo Toll (TLRs) são proteínas transmembranas que se caracterizam por possuírem repetições ricas em leucina, flanqueadas por regiões ricas em cisteínas em sua porção extracelular (Figura 8). 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 sinais que desencadeia a expressão de vários genes controladores da imunidade inata e adquirida (RE e STROMINGER, 2004).

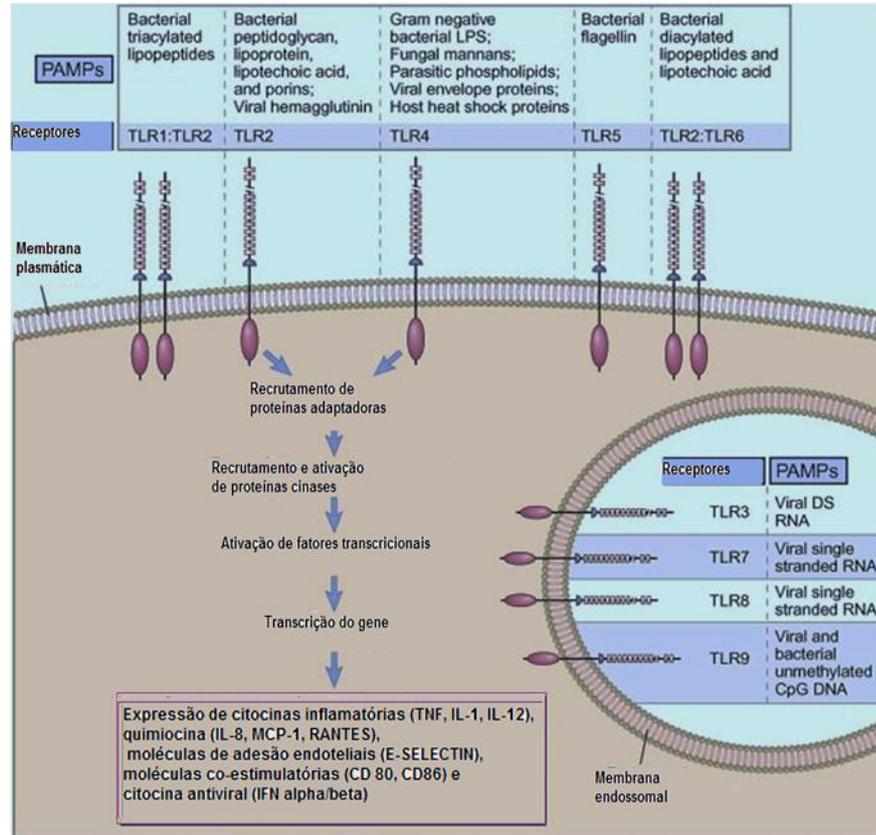


Figura 8: TLRs de mamíferos: especificidades, mecanismos básicos de sinalização e respostas celulares. Fonte: ABBAS *et al.*, 2008.

Sob reconhecimento do ligante cognato, cada TLR desencadeia respostas distintas em associação com uma combinação diferente de adaptadores contendo o domínio TIR: MyD88, TIRAP/MAL, 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-1 (IL-1R-associated kinase-1), IRAK-4 e TRAF6 (tumour necrosis factor receptor-associated factor 6) em um complexo. IRAK-1 e TRAF6 se dissociam e interagem com TAK1 (transforming grows factor- β -activated kinase), levando a ativação desta cinase. TAK1 ativada, fosforila IKK-b (I κ B cinase) e MAPcinase cinase 6 (MKK6), culminando com a degradação de I κ B, deixando o fator nuclear κ B (NF- κ B – nuclear factor κ b) ser translocado ao núcleo e como fator de transcrição, ativar múltiplos genes de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 (interleucina 12)

induzir IL-12 e TNF- α quando estimulados com *Brucella abortus* morta pelo calor (HKBA – *heat-killed B. abortus*). Trabalhos relatando o papel da molécula adaptadora MyD88 na resposta *in vivo*, demonstraram a exarcebação da brucelose murina em camundongos deficientes para tal molécula adaptadora (WEISS *et al.*, 2005; MACEDO *et al.*, 2008). Estudos realizados em nosso grupo demonstraram a diminuição do processo de maturação de células dendríticas e a ausência de produção de IL-12 (interleucina 12) e TNF- α (fator de necrose tumoral- α) em macrófagos e células dendríticas de camundongos MyD88^{-/-} em resposta ao estímulo com HKBa (MACEDO *et al.* 2008).

O receptor TLR2 tem sido relacionado à expressão de TNF- α em células dendríticas e macrófagos estimulados com HKBa (HUANG *et al.*, 2003). Contudo, em relação ao controle da infecção *in vivo*, Campos *et al.* (2004), demonstraram que camundongos TLR2^{-/-} são tão resistentes quanto os camundongos selvagens.

Em relação ao receptor TLR4, 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. Além disso, a presença deste receptor é 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). 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.

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).

A produção de óxido nítrico (NO) é um eficiente mecanismo pelo qual o macrófago destrói a bactéria e são estimulados pelas citocinas da imunidade inata como IFN- γ e TNF- α (JONES e WINTER, 1992; JIANG *et al.*, 1993). Estudos “*in vitro*” demonstraram que reativos intermediários de oxigênio são

requeridos para o controle intracelular da *B. abortus*, durante a fase aguda de infecção no macrófago (JIANG *et al.*, 1993; KO *et al.*, 2002).

Outra característica importante da imunidade inata contra a *B. abortus* é a atividade citotóxica das células Natural Killer (NK), (SALMERON *et al.*, 1992). Células NK bovinas atuam diretamente através da secreção de IFN- γ (GOLDING *et al.*, 2001). Sendo que esta citocina estimula a atividade bactericida do macrófago (OLIVEIRA *et al.*, 2002; WYCKOFF, 2002). Proteínas do sistema complemento contribuem principalmente para a resposta imune inata primária, através do papel de opsonização e imediata eliminação da *Brucella* extracelular ou pela interação com a bactéria neutralizada pelo anticorpo (CORBEIL *et al.*, 1988).

3.2- IMUNIDADE ADQUIRIDA

A imunidade adquirida contra a infecção pela *B. abortus* em camundongos é mediada principalmente por linfócitos T e suas citocinas. Os anticorpos têm o papel secundário de opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção (CHEERS e HO, 1983), tornando-o mais propício à fagocitose pelos macrófagos (WINTER *et al.*, 1989). A habilidade da bactéria em sobreviver e repicar dentro dos macrófagos e outras células do hospedeiro, torna-a inacessível a mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e o sistema do complemento (CHEERS e HO, 1983). Apesar dos anticorpos terem o seu papel na imunidade adquirida contra a *Brucella*, estes não são capazes de reduzir a taxa de crescimento intracelular *in vivo* e nem são capazes de conferir resistência a camundongos susceptíveis.

Basicamente a imunidade mediada por células consiste de dois tipos de reações: a morte da bactéria fagocitada em consequência da ativação dos macrófagos pelas citocinas derivadas das células T, em especial o IFN- γ e a lise das células infectadas pelos linfócitos T CD8⁺. Na infecção pela *Brucella abortus*, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que secretam um padrão de citocinas do tipo Th1 são responsáveis pelo processo de resolução da infecção (ZHAN *et al.*, 1993 e OLIVEIRA *et al.*, 1996 e 1998). Vários estudos já demonstraram que as células TCD8⁺ e CD4⁺ induzem um nível equivalente de proteção.

Sendo assim, a identificação das citocinas induzidas pela infecção por *B. abortus* e a elucidação de suas funções específicas é fundamental para o entendimento da imunidade na brucelose. Citocinas derivadas de macrófagos como IL-1, IL-12 e TNF- α , consideradas pró-inflamatórias, contribuem para o controle inicial da infecção por *Brucella*. A IL-12 estimula as células NK e células T a produzirem IFN- γ e conseqüentemente ativarem os macrófagos a destruírem as bactérias intracelulares. A produção de IL-12 também promove a diferenciação das células auxiliares T CD4⁺ para o fenótipo Th1 além de ativar as células T CD8⁺ promovendo a mudança do fenótipo Tc0 para Tc1 e tornado-as citotóxicas as células infectadas por esta bactéria. No modelo da brucelose murina, a deficiência na produção de IL-12 endógena aumenta a susceptibilidade dos camundongos à infecção pela *B. abortus*, estes camundongos mostram uma

diminuição na produção de IFN- γ e óxido nítrico (NO) e um aumento do número de bactérias no baço e no fígado (ZHAN *et al.*, 1996)

Os linfócitos do tipo Th1 secretam IFN- γ como a principal citocina efetora contra a infecção por bactéria intracelulares, incluindo a *Brucella*. Esta citocina possui duas principais funções no controle da brucelose. Primeiro o IFN- γ ativa os macrófagos a produzirem reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio e enzimas proteolíticas capazes de destruir a bactéria fagocitada e depois esta citocina estimula a produção de anticorpos das subclasse IgG2a em camundongos, os quais ativam o sistema do complemento e opsonizam a bactéria facilitando a fagocitose, favorecendo assim as funções efetoras dos macrófagos (ABBAS *et al.*, 1996). O TNF- α possui efeito sinérgico com a citocina IFN- γ , e na ausência desta, atua como um potente ativador de macrófagos, medeia a produção de IL-12, induz a produção de óxido nítrico além de ativar a atividade bactericida nos macrófagos.

Evidências sugerem que IFN- γ é importante para o controle da infecção pela *B. abortus* em camundongos. Macrófagos ativados pelo IFN- γ controlam a replicação dessa bactéria intracelular “in vitro” (JONES *et al.*, 1992; JIANG *et al.*, 1993) e a neutralização do IFN- γ endógeno “in vivo”, resulta na diminuição do controle da infecção (KHAN *et al.*, 1993). Tratamento de camundongos com IFN- γ recombinante resultaram no aumento da resistência contra a cepa virulenta 2308 (STEVENS *et al.*, 1992).

4- IL-10

As citocinas são polipeptídeos que atuam de forma não enzimática, em concentrações nanomolares ou picomolares, regulando crescimento, diferenciação e função de várias células ou linhagens celulares. A produção ocorre durante a fase efetora da imunidade inata e adaptativa, atuando como mediadoras e reguladoras da resposta imune. Geralmente são caracterizadas pelos efeitos como: estimulantes (pró-inflamatórios) ou inibidores (anti-inflamatórios), não se limitando ao sistema hematopoético (HAUSER, 1995). A célula alvo pode ser a mesma que secreta a citocina (autócrina), uma célula vizinha (parácrina) ou uma célula distante, estimulada por meio de citocinas secretadas na circulação (endócrina) (ABBAS *et al.*, 2008).

Fiorentino *et al* (1989), descreveram uma substância presente no sobrenadante de cultivos celulares de linfócitos que era capaz de inibir a produção de citocinas provenientes de células Th1, em cultivos celulares. Tal substância foi denominada Fator Inibidor da Síntese de Citocinas. Posteriormente essa citocina passou a ser chamada de Interleucina-10 (IL-10), uma vez que as análises imunológicas e bioquímicas indicaram que o Fator Inibidor da Síntese de Citocinas era uma nova citocina (MOORE *et al.*, 1990).

A IL-10 tem uma estrutura homodimérica, com 18 kDa, sem carboidratos detectáveis, constituído por uma cadeia polipeptídica que se estrutura em quatro α -hélices (Figura 10) (VIEIRA *et al.*, 1991; WALTER *et al.*, 1995; ZDANOV *et al.*, 1995).

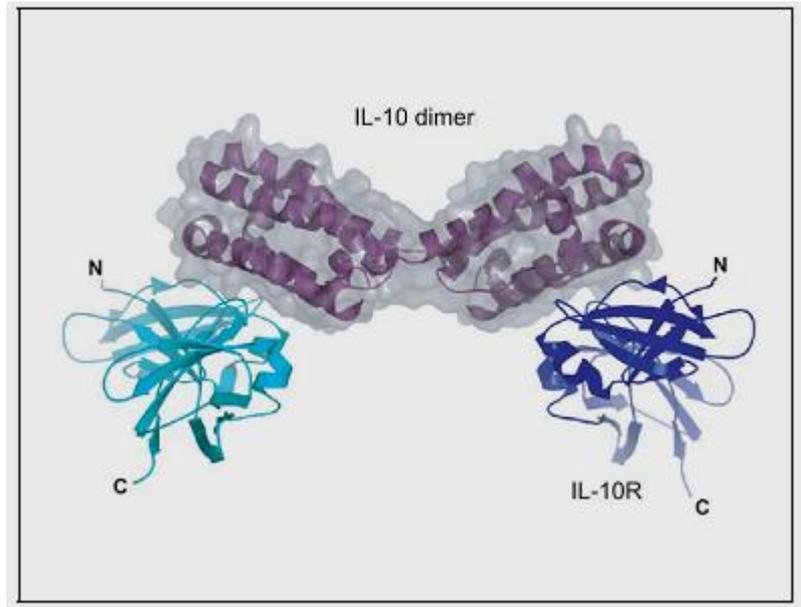


Figura 10: Estrutura tridimensional da IL-10 e do IL-10R. Fonte: <http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2004/issue231/images/large/2312004re7F8.jpeg>

O gene IL-10 contém cinco éxons e ocupa aproximadamente 5,1 kb no cromossomo 1 (KIM *et al.*, 1992), entre 1q31 e 1q32 (ESKDALE *et al.*, 1997). Em contraste com o que ocorre com os genes que codificam outras citocinas, a transcrição do gene IL-10 pode ser regulada por fatores transcricionais Sp1 e Sp3, expressos constitutivamente em diferentes tipos celulares. Esses fatores transcricionais ligam-se às seqüências-consenso ricas em G e C, presentes na região promotora do gene IL-10 (BRIGHTBILL *et al.*, 2000; TONE *et al.*, 2000).

Genes homólogos ao IL-10 foram identificados no genoma humano (JIANG *et al.*, 1995, 1996; SU *et al.*, 1998; DUMOUTIER *et al.*, 2000; KNAPPE *et al.*, 2000; XIE *et al.*, 2000) e também no genoma murino (SOO *et al.*, 1999; DUMOUTIER e RENAULD, 2002), mas suas atividades biológicas não estão bem caracterizadas.

A IL-10 se liga ao receptor IL-10R1 com alta afinidade. O IL-10R1 utiliza uma subunidade acessória para a sinalização, IL-10R2 (BACH, AGUET e SCHREIBER, 1997). A ativação que acontece após a ligação da IL-10 a seus receptores ocorre em função da via de transdução de sinal JAK/STAT (STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription) (SHUAI *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1994; ZIHONG, WEN e DARNELL, 1994). A fosforilação das

tirosinas-quinases desendadeiam a dimerização de STATs que deslocados para o núcleo, atuam sobre genes-alvo, podendo inibir a expressão dos genes que codificam outras citocinas, como IFNs (ITO *et al.*, 1999; YAMOAKA *et al.*, 1999).

Os monócitos/macrófagos ativados são os tipos celulares predominantemente responsáveis pela síntese da IL-10 (DE *et al.*, 1991). A IL-10 também pode ser produzida por linfócitos Th2, linfócitos Th0 (FIORENTINO, BOND e MOSMANN, 1989), células B (BURDIN *et al.*, 1993), queratinócitos (ENK e KATZ, 1992) e células dendríticas (IWASAKI e KELSALL, 1999).

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória que inibe a síntese de vários mediadores inflamatórios normalmente secretados por monócitos/macrófagos ativados, tais como: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos), G-CSF (Fator Estimulador de colônias de Granulócitos), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Monócitos), TNF (Fator de Necrose Tumoral), LIF (Fator Inibidor da Leucemia), PAF (Fator Ativador de Plaquetas), TFA (Fator Ativador Tissular) (DE *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991; GRUBER, WILLIAMS e GERRARD, 1994), quimiocinas (BERKMAN *et al.*, 1995; KOPYDLOWSKI *et al.*, 1999; VELTROP *et al.*, 2001) e PGE2 (Prostaglandina-E2) (NIIRO *et al.*, 1994, 1995).

Na totalidade dos estudos, os monócitos/macrófagos parecem ser os alvos principais da IL-10 que inibe a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD54 (ICAM-1), CD80 (B7) e CD86 (B7.2) em monócitos, mesmo após a indução dessas moléculas por IL-4 ou IFN- γ , reduzindo drasticamente a proliferação de linfócitos T (DE *et al.*, 1991; STEINBRINK *et al.*, 1997, 1999, 2002). Ao contrário, a IL-10 estimula a expressão de receptores para a porção Fc de IgG (Imunoglobulina G) em monócitos/macrófagos humanos, fato correlacionado com o aumento da sua capacidade fagocítica (TE VELDE *et al.*, 1992; CAPSONI *et al.*, 1995; SPITTLER *et al.*, 1995).

Diferentes populações de células dendríticas produtoras de IL-10 foram identificadas nas placas de Peyer e no fígado, e estão associadas com a resposta do tipo Th2 que induz a um estado de tolerância (IWASAKI e KELSALL, 1999; KHANNA *et al.*, 2000). Em geral, os efeitos da IL-10, sobre as células

dendríticas são consistentes com a inibição da resposta inflamatória Th1 (MOORE *et al.*, 2001; McGUIRK, CANN e MILK, 2001).

A inibição das células Th1 pela IL-10 parece ser mediada via inibição da síntese de IL-12, um co-estimulador que é necessário para a produção de citocinas Th1, por células T e macrófagos (GERMANN, PARTENHEIMER e RUDE, 1990). A IL-10 inibe fortemente a produção da citocina IL-12, a qual pode induzir a síntese de IL-10 por células T, sugestivo de que o sistema imune é equipado com um mecanismo de “feedback negativo”, relacionado à ativação das células T (MEYAARD *et al.*, 1996).

O efeito inibidor da IL-10 é um importante fator limitante da duração e do dano patológico das respostas inflamatórias (MOORE *et al.*, 2001; KENDALL *et al.*, 2001; COOK *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2006).

A IL-10 tem sido relacionada à geração de um subtipo de Treg (células T reguladoras) (Figura 11), chamada de Tr1. Os animais deficientes em IL-10 desenvolvem anemia, retardo no crescimento e doença inflamatória intestinal (DII) crônica, com infiltrado leucocitário transmural durante o envelhecimento. Como visto nos camundongos deficientes em IL-2, o desenvolvimento da colite em camundongos deficientes em IL-10, é determinado pela interação entre fatores imunes, ambientais e genéticos. Há relatos na literatura que os camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem prolapso de reto com 12 semanas de vida. Segundo Berg *et al.* (1996), camundongos deficientes em IL-10 derivados e mantidos em condições SPF (Specific Pathogen-free), invariavelmente desenvolvem enterocolite crônica com 2-3 meses de idade, enquanto não houve evidência da doença em neonatos. As células T CD4⁺ são as células que medeiam à colite nesse modelo de deficiência em IL-10 (KUHN *et al.*, 1993; BERG *et al.*, 1996; DAVIDSON *et al.*, 1998).

Fernades e Baldwin (1995) avaliaram o papel da IL-10 na infecção pela *B. abortus*. Foi demonstrado, com 1 semana após a infecção, o aumento da IL-10 “in vitro”, quando células cultivadas do baço foram estimuladas pela bactéria morta pelo calor (HK2308). Contudo “in vivo” foi utilizada a neutralização da IL-10 endógena utilizando anticorpos anti-IL-10, resultando na diminuição significativa, do número de bactérias recuperadas no baço, após 1 semana de infecção. A

neutralização da IL-10 também resultou no aumento da produção de IFN- γ e controle mais eficiente da infecção. Outro mecanismo pelo qual a IL-10 inibe a produção de IFN- γ , pelos linfócitos humanos, é pela supressão da produção de IL-12 ou Fatores Estimuladores das células Natural Killer (NKSF).

Estudos demonstraram o envolvimento de altos níveis da IL-10 durante a infecção crônica com *M. tuberculosis*, sendo associada com a reativação da bactéria em camundongos e pacientes (ERBON *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2002). Previamente foi reportado o aumento da resistência a infecções pelo *Mycobacterium*, em camundongos deficientes da IL-10 (JACOBS *et al.*, 2000; BEAMER *et al.*, 2008

A IL-10 é uma citocina importante no desenvolvimento e regulação da resposta imune. Avaliar o seu papel nas infecções, como com a bactéria *B. abortus*, leva a compreensão dos mecanismos imunes de causa, efeito e modulação. O conhecimento da função da IL-10 nos leva ao entendimento dos mecanismos de regulação, homeostase e controle.

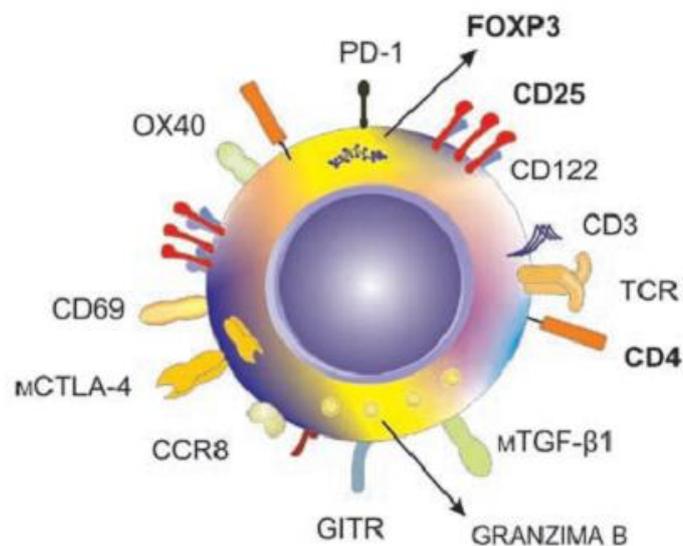


Figura 11: Característica fenotípica de uma célula Treg. Rev. Bras.Reumatol, v 48 n 6 p 342-355 nov/dez, 2008.

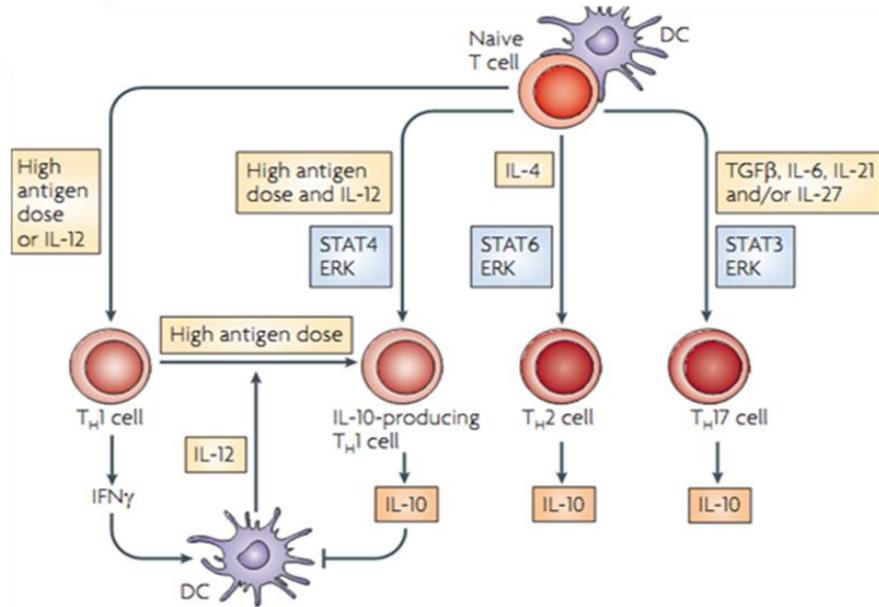


Figura 12: Expressão da IL-10 pelas células T. Nature Immunology Review, 2010.

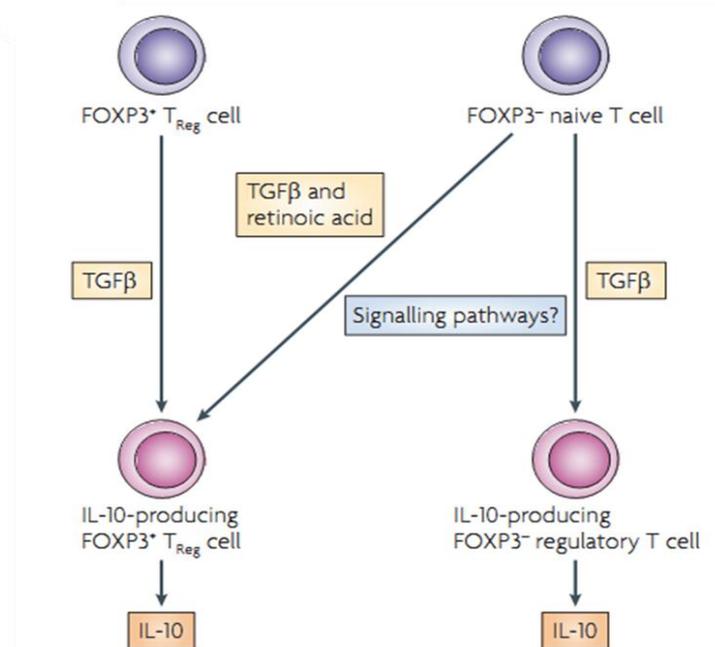


Figura 13: Indução de células Treg produtoras de IL-10 pela ação do TGF- β . Nature Immunology Review, 2010.

Saraiva e O'Garra em 2010, destacaram os vários tipos de células T envolvidas na produção da citocina IL-10, bem como a supressão de fenótipos de células T devido a sua secreção (figura 12). Adicionalmente foi relatada a indução da produção de IL-10 pelas células Treg Foxp3⁺ (fator transcripcional), através da citocina TGF- β , como também por células Treg naive Foxp3⁻, além de atuar juntamente com o ácido retinóico na indução destas células Treg naive em produtoras de IL-10 (figura 13).

5- OBJETIVOS

5.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da IL-10 endógena na infecção pela bactéria *Brucella abortus* em modelo murino.

5.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciação e cultura de células dendríticas e macrófagos derivados da medula óssea de camundongos IL-10 knockout.

- Avaliação “in vitro” do papel da IL-10 endógena na modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias: IFN- γ , IL-17, TNF- α e a expressão do gene *TGF- β* , após a infecção pela bactéria *Brucella abortus* por ELISA e PCR em tempo real.

- Avaliação “in vivo” do curso da infecção pela bactéria *Brucella abortus* em camundongos IL-10 knockout após 1, 2 e 6 semanas de infecção.

- Determinar o papel da IL-10 na indução da patologia no baço e fígado após a infecção pela bactéria *Brucella abortus*.

- Avaliação do papel da IL-10 endógena na geração de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg) pela análise por citometria de fluxo, em animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev infectados pela bactéria *B. abortus*.

6- MATERIAIS E MÉTODOS

6.1- MODELO ANIMAL

Foram utilizados camundongos IL-10 knockout (IL-10 KO), gentilmente cedidos pela Prof^a. Donna Marie McCafferty, provenientes do “Gastroenterology Group, Calgary University”, Calgary, Canada. Os animais foram recebidos pela Prof^a. Ana Caetano, da Universidade Federal de Minas Geral (UFMG) e posteriormente doado ao biotério do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, do ICB/UFMG, onde os animais foram mantidos. Além disso, foram utilizados camundongos 129 Sv/Ev, mantidos no mesmo biotério, usados como grupo controle. Os animais utilizados possuíam entre 6 a 12 semanas.

6.2- CEPAS BACTERIANAS

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

6.3- CONDIÇÕES DE CULTIVO BACTERIANO

A cepa S2308, que foi utilizada na infecção ou como antígeno na cultura de células, foi crescida em meio *Brucella Broth* líquido (BB) (DIFCO), a 37°C sob agitação constante. Após três dias de crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada e o sedimento foi ressuspendido em tampão salina fosfato (PBS) 0,15 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.

Com a finalidade de obter bactérias inativadas, após determinada a concentração bacteriana, alíquotas desta suspensão foram colocadas em banho-maria, a 80°C, durante 1,5 horas sendo agitadas a cada 15 minutos. Para certificação da inativação das bactérias, amostras foram plaqueadas em meio BB solidificado, e incubado por 72 horas, a 37°C. As bactérias inativas pelo calor são referidas neste estudo pela sigla HKBA.

6.4- EXTRAÇÕES, CULTIVOS E DIFERENCIAÇÕES DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos IL-10 knockout e 129 Sv/Ev foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. As extremidades proximais e distais destes ossos foram seccionadas e foi injetado 5 mL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GIBCO) por osso.

A suspensão de células obtida foi centrifugada a 600g por 10 minutos, a 4°C, e o precipitado foi ressuscitado em 10 mL/por animal de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO) 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, foram plaqueadas em placas de petri para cultivo celular e incubadas por duas horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, de maneira a obter apenas células que ainda não se diferenciaram. Para isso, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 600 g por 10 minutos, a 4°C, e ressuscitadas em 2 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer.

As células extraídas da medula foram diferenciadas em macrófagos plaqueando-as em placas de 24 poços na concentração de 5x10⁵ células/mL/poço. As células foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1 M (GIBCO) 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 e sob atmosfera com 5% de CO₂.

Quatro dias após o plaqueamento das células, foram adicionados 100 µL de LCCM por poço e no sétimo dia, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo também 10% de LCCM. No décimo dia de cultura as células estão completamente diferenciadas em macrófagos (Gomes & Appelberg, 2002).

Os macrófagos derivados da medula óssea (BMMØs) foram estimulados, no décimo dia de cultura, com a cepa S2308 da *B. abortus*, com a *B. abortus* inativada pelo calor (HKBA) e com agonistas dos TLRs. 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. Os estímulos foram utilizados como representado na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração dos estímulos utilizados

Estímulos	Concentrações
S2308	MOI de 1000:1
HKBA	MOI de 1000:1
LPS (Agonista de TLR4) ou/ConA	1 µg/mL ou/5,0 µg/mL
Meio (Controle)	500µl/poço

Foi utilizado o meio como controle de células não estimuladas e o sobrenadante da cultura foi coletado 24 horas após estimulação para dosagem das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12, IL-10, TNF-α e também óxido nítrico (NO).

Dentre as perspectivas do trabalho, foi extraídas células da medula óssea para diferenciação em células dendríticas, sendo assim, as células foram plaqueadas 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) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% dos antibióticos

penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO) e 30% de GM-CSF (fator estimulante de macrófago e granulócitos). As placas foram então incubadas a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂.

No terceiro dia após o início da cultura foi adicionado 5 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO) e 30% de GM-CSF. No quinto dia, retirou-se 4 mL da cultura e adicionou-se 5 mL de DMEM suplementado como descrito acima/placa.

No décimo dia de cultura as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 600 g por 10 minutos, a 4°C, e ressuspendidas em 1 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer.

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, estimulou-se as células e o sobrenadante foi coletado com 24 após a estimulação, para a dosagem das citocinas.

6.5- INFECÇÃO “IN VIVO”

Cinco camundongos de cada grupo de animais IL-10 knockout e 129 Sv/Ev foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC da cepa virulenta S2308 da *B. abortus*. Esses camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Após o sacrifício, o baço foi extraído com o auxílio de pinça e tesoura estéreis e realizada a cinética de infecção com 1, 2, 3 e 6 semanas após a infecção.

6.5.1- DETERMINAÇÃO DA 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 diluídos. As diluições 10^{-3} a 10^{-4} , para a 2ª semana após a infecção, foram plaqueadas, em duplicata, em meio BB Agar. De acordo com a cinética foram alteradas as diluições plaqueadas. 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 log de UFC de cada grupo.

6.5.2- CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Os camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO foram infectados com 1×10^6 bactérias pela via intraperitoneal sendo então mantidos em observação até 14 semanas após a infecção para análise de sobrevivência. Além disso, foram observados os sexos em relação as mortes.

6.5.3- CULTURA E ESTIMULAÇÃO DE ESPLÊNÓCITOS

As suspensões de células obtidas após os baços serem macerados foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 600g. Posteriormente, o sobrenadante do centrifugado foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão ACK (1% KHCO_3 e 8% NH_4Cl em água destilada) 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 2 mL de meio RPMI (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 $\mu\text{g/mL}$, GIBCO) e a concentração das células foi determinada na câmara de Neubauer.

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC). As células foram estimuladas com *B. abortus* S2308 (MOI de 100:1), *B. abortus* S2308 inativada pelo calor (HKBA) também na MOI de 100:1. Células não estimuladas (meio) foram usadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5,0 $\mu\text{g/mL}$) e/ou LPS de *Escherichia coli* (1,0 $\mu\text{g/mL}$) serviram como controle positivo. Após 48 e 72 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO_2 , os sobrenadantes dos esplenócitos foram coletados para a quantificação da produção de IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α .

6.5.4- DOSAGEM DE CITOCINAS

Foram dosadas as citocinas TNF- α e IL-10 da cultura de esplenócitos (48 horas após estimulação) e IFN- γ , IL-10, IL-17 (72 horas após a estimulação).

Dos sobrenadantes das culturas de macrófagos derivados da medula óssea foram dosados TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12. Todos os sobrenadantes foram coletados após 24 horas de estimulação.

As dosagens foram baseadas no método de ELISA sanduíche, utilizando os kits fornecidos pela R&D System de acordo com o protocolo dos fabricantes.

6.5.5- DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A dosagem da concentração do NO foi feita a partir do método colorimétrico de Greiss. Resumidamente, 50 μL dos sobrenadantes das culturas de células e da curva padrão contendo NaNO_2 (pico da curva: 200 μM) 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 Excel e Prisma.

6.6- ANÁLISES DO PERCENTUAL DAS CÉLULAS CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ POR CITOMETRIA DE FLUXO

Cinco camundongos de cada grupo (129 Sv/Ev e IL-10 KO), tiveram o baço coletado e os esplenócitos foram cultivados, conforme mencionado no item 6.5.2. Uma, 2, 3 e 6 semanas após a infecção intraperitoneal com a *B. abortus* S2308

Para iniciar as marcações de superfície, as placas de cultura foram centrifugadas a 600g por 10 minutos e, em seguida os sobrenadantes foram rapidamente removidos por rápida inversão (flicagem). As células foram então ressuspendidas em 60 µL de tampão de FACS (2% Albumina Bovina Sérica e 0,1% NaN₃ em PBS - SIGMA) contendo 0,5mg/ml(estoque) utilizados 1:87,5de diluição do anticorpo bloqueador de receptores FcII/III (FcRII/III), a fim de se evitar marcações inespecíficas. Após 20 minutos de incubação a 4°C, as placas de cultura foram submetidas novamente à centrifugação e foram adicionados, a cada poço, 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpos para a marcação de superfície. Essas marcações, bem como a concentração de cada anticorpo, estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Marcações analisadas na população de esplenócitos.

Anticorpos	Marcações	Estoques/diluições usadas
anti-CD4 (e Bioscience)	FITC	0,5mg/ml/ 1:62,5
anti-CD25 (e Bioscience)	Cy5	0,5mg/ml/ 1:50
anti-Foxp3 (e Bioscience)	PE	0,2mg/ml/ 1:62,5

Seguida à adição dos anticorpos, a placa foi incubada por 20 minutos a 4°C. As placas foram depois submetidas a 3 etapas de lavagem, onde foram centrifugadas a 600g por 10 min, o sobrenadante retirado e as células ressuspendidas em 150µL de tampão de FACS.

Para iniciar a marcação intracitoplasmática, as placas foram novamente lavadas, conforme descrito acima, e as células ressuspensas em tampão de FACS acrescido de 0,5% de saponina (SIGMA). Mais uma etapa de lavagem foi realizada e as células foram marcadas com o anticorpo anti- Foxp3 (e Bioscience) PE e incubadas por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, as placas foram submetidas a três etapas de lavagem, onde foram centrifugadas a 600g por 10 minutos e o sobrenadante retirado. Após a primeira centrifugação, as células foram ressuspensas em 150µL de tampão de FACS acrescido de 0,5% de saponina. Após a segunda centrifugação, apenas o tampão de FACS foi utilizado para ressuspender as células e após a terceira centrifugação foi utilizado o PBS. Em seguida, as células foram transferidas para tubo de FACS (CORNING). As amostras foram coletadas em um citômetro FACScan (Becton & Dickinson), onde 30.000 eventos foram adquiridos.

Os resultados foram analisados através do programa de computador FlowJo (Tree Star Inc. Ashland, EUA). A zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células, e a porcentagem das células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ foi determinada.

6.7- ANÁLISES DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES POR PCR EM TEMPO REAL

6.7.1- EXTRAÇÃO DE RNA

A suspensão de células obtidas do baço macerado em PBS foi utilizada para cultura de esplenócitos segundo descrito por Macedo *et al.* (2008). As hemácias foram lisadas utilizando a solução ACK (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA [pH7.3]) e os esplenócitos foram cultivados em placas de 96 poços com fundo em “U” a uma concentração de 10⁶ células por poço. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino inativado por calor e 1% de penicilina e estreptomicina. As culturas foram estimuladas com a bactéria viva S2308 (10⁸ UFC) ou meio de cultura (controle não estimulado). Os sobrenadantes das culturas foram dispensados e a partir

das células sedimentadas foram homogeneizadas com o reagente TRIzol (Invitrogen) para a extração do RNA total dessas células a 72 horas após a estimulação para a análise de expressão de TGF- β . O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e 1 μ g de RNA total para a síntese do cDNA fita simples de acordo com os dados do fabricante utilizando o kit Illustra™ Ready-to-Go™ RT-PCR Beads (GE Healthcare) , utilizado para as análises posteriores.

6.7.2- PCR EM TEMPO REAL

Para análise da expressão diferencial de TGF- β , 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores foram escolhidos por serem referentes aos genes que codificam TGF- β ou β -actina. Os iniciadores foram desenhados utilizando dados da literatura ou através do *software* RTPPrimerDB. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 3.

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

Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi β -actina. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e

quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas.

Tabela 3. Seqüência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real

Primer	Seqüência
<i>TGF-β F</i>	5' TGACGTCACTGGAGTTGTACGG 3'
<i>TGF-β R</i>	5' GGTTTCATGTCATGGATGGTGCC3'
<i>β-Actin F</i>	5' AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA 3'
<i>β-Actin R</i>	5' TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT 3'

6.8- ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICA

Fragmentos do fígado de camundongos infectados ou não foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas, seguidos por desidratação em álcool crescente, diafinização em xilol e embebição em parafina. Os fragmentos foram seccionados em cortes de 5 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica. As lesões inflamatórias foram contadas por uma ocular dividida em quadrantes (gratícula), de acordo com os parâmetros: (1) Espaço porta, (2) Veia centro lobular, (3) Granuloma, (4) Necrose com presença de trombos e (5) Parênquima hepático (hepatócitos). As contagens referentes às gratículas foram de 10/lâmina x 5 animais por grupo x 5 características analisadas, totalizando 250 imagens/lâmina, para os tempos de 1, 2 e 6 semanas após a infecção. Após a finalização da contagem houve a soma, transformação em porcentagem e transformação angular (Excel: arcoseno), para posterior análise estatística pelo Prisma. A estatística foi dada em transformação angular e os dados representados em porcentagem de acordo com o trabalho de Rolán *et al.*, 2009.

Para associar as lesões histopatológicas com a presença intralésional do agente *B. abortus*, foi realizada a imunohistoquímica dos fígados trocados do formol para o primeiro álcool 70% com 24 horas, seguindo o protocolo descrito por Xavier *et al.*, 2009b. Anteriormente a todo o processo, foram mantidos 2 coelhos como fontes dos anticorpos primário. Os coelhos foram infectados com 2×10^{10} bactérias B19 (amostra vacinal) *B. abortus*. O soro destes animais foi coletado e titulado, após 2 inoculações sendo utilizados posteriormente.

Resumidamente, os cortes em lâminas silanizadas foram diafinizados, hidratados em álcool decrescente, lavados com PBS por 5 minutos e incubados com solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 30 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Após lavar novamente com PBS, as lâminas foram transferidas para câmara úmida à temperatura ambiente e incubadas com solução de leite em pó desnatado (25 µg/ml) por 45 minutos, para diminuir marcações inespecíficas no corte. Posteriormente, os cortes foram incubados por 30 minutos com anticorpo primário, utilizando soro diluído (1:5000) de coelhos experimentalmente infectados com amostra virulenta B19 (amostra vacinal) *B. abortus*. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes com PBS, incubados com anticorpo secundário biotilado (Anti- Ac Coelho; Dako) por 20 minutos, seguida de nova lavagem com PBS e incubação por 20 minutos com complexo de estreptoavidina-peroxidase de kit comercial (LSAD+ Kit, DAKO Corporation, CA, EUA). A reação foi revelada com 0,024% de diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) e os cortes contracolorados com hematoxilina de Mayer. Os tecidos foram avaliados quanto à imunodeteção da bactéria associadas às alterações inflamatórias presentes nos tecidos.

6.9- ANÁLISES DA ÁREA DOS GRANULOMAS POR MORFOMETRIA DIGITAL

Durante o sacrifício dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO, nas 1^a, 2^a 3^a e 6^a semanas após a infecção com a *B. abortus* S2308 o fígado de cada animal infectado ou não (grupo PBS) foram coletados e fixados em paraformaldeído 10% ($n = 5$ para cada grupo). Após 72 horas os fígados foram cortados

longitudinalmente, por uma lâmina de bisturi, para aproveitamento da área, sendo selecionado o maior lóbulo. Observou-se diariamente a impregnação do formol 10% em cada fragmento. Posteriormente, foram realizadas as passagens nos alcoóis e finalizando em uma única passagem no Xilol. Em seguida os fragmentos de fígado foram encaminhados para o laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral do ICB – UFMG, e então processados em parafina. Cortes histológicos de 6-7 μm foram obtidos utilizando um micrótomo. As lâminas foram coradas com HE, pelas próprias técnicas do departamento de Patologia.

A metodologia empregada para a captura de imagens no microscópio e definição das condições de morfometria foi descrita por Caliarì (1997). Além disso, a captura das imagens foi realizada no microscópio óptico do próprio laboratório de imunologia das doenças infecciosas, sendo possibilitado devido à gentil colaboração do Professor Marcelo Caliarì quem foi o responsável pela calibração do aparelho, viabilizando a sua utilização. Para medição da área do granuloma de cada animal, foram capturadas trinta imagens/lâmina, pelo método de varredura cartesiana linear, utilizando um microscópio óptico Olympus CX 31, na objetiva de 40x, sendo estas digitalizadas através da microcâmera Olympus U/CMAD 3, SC 300.

A área do granuloma hepático foi obtida através do programa de computador KS300 2.0 contido no analisador de imagens Carl Zeiss, do laboratório do Professor Marcelo Caliarì. Os pixels do granuloma foram selecionados através da imagem real com subsequente criação de uma imagem binária (MACRO) e obtenção da área em μm^2 . A área do granuloma de cada animal foi dada pela somatória da área obtida nas trinta imagens analisadas/lâmina de cada camundongo. Os resultados foram expressos pelo programa excel referente as áreas (somatório e média) de cada grupo analisado, levados ao Prisma, onde foi realizada a análise estatística por ANOVA e teste de Tukey. Esta metodologia foi realizada no laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral do ICB – UFMG.

6.10- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

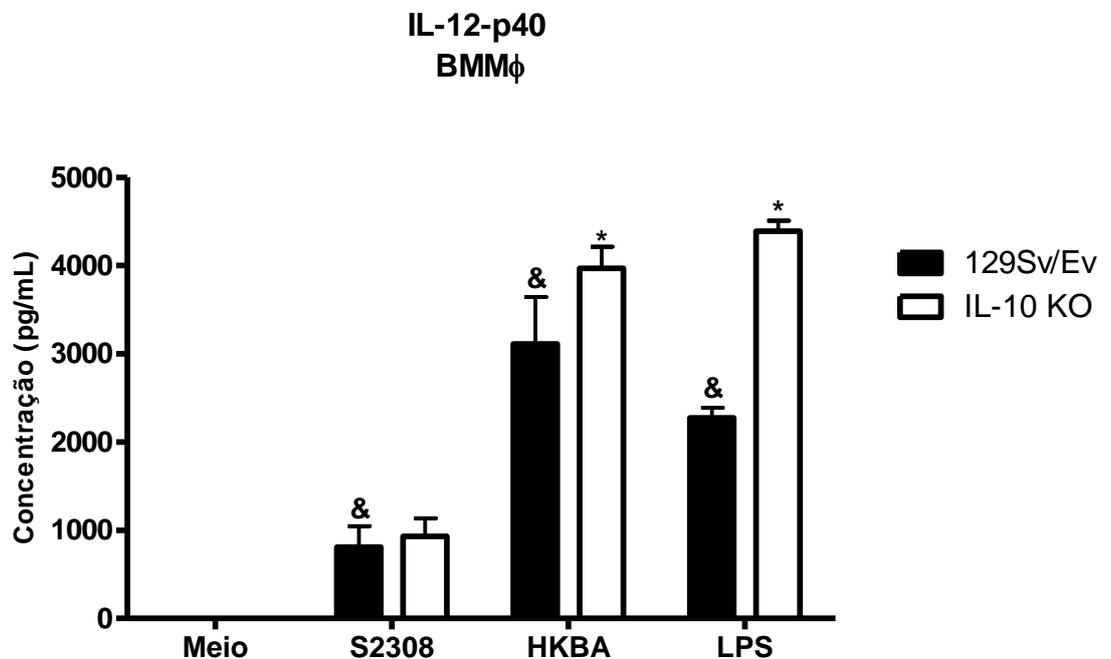
Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados por ANOVA através do teste de Tukey e em alguns casos específicos pelo teste *t* de Student, utilizando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc). O nível de significância adotado nas análises foi de $p < 0,05$.

7- RESULTADOS E DISCUSSÃO

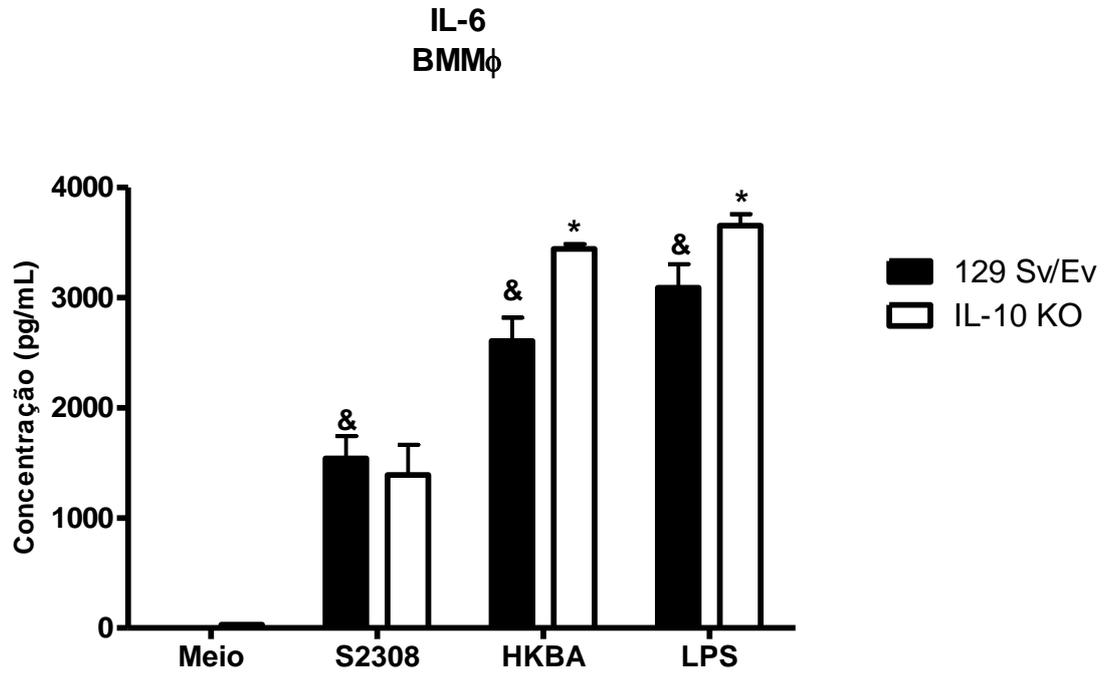
7.1- BRUCELLA *abortus* MORTA PELO CALOR (HKBA) INDUZ MAIOR PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMM ϕ) DE ANIMAIS IL-10 KO

As células da medula óssea dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO foram cultivadas e derivadas em macrófagos. Após 24 horas de estimulação foram coletados os sobrenadantes desta cultura e dosadas as citocinas por ELISA. A produção de óxido nítrico (NO) foi dosada pelo método colorimétrico de Greiss.

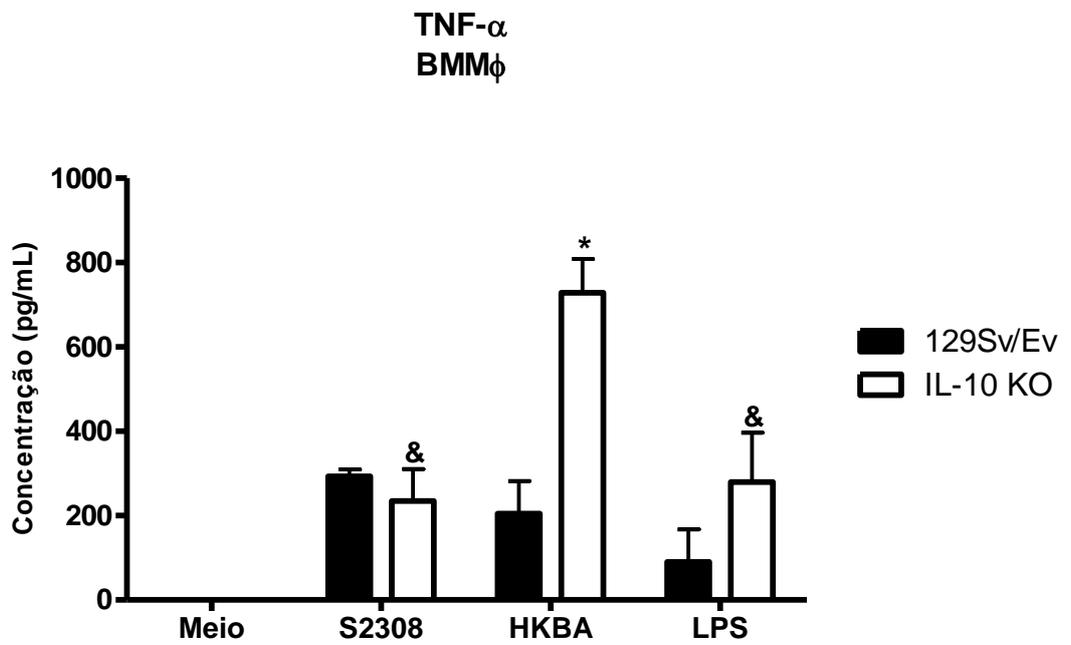
A)



B)



C)



D)

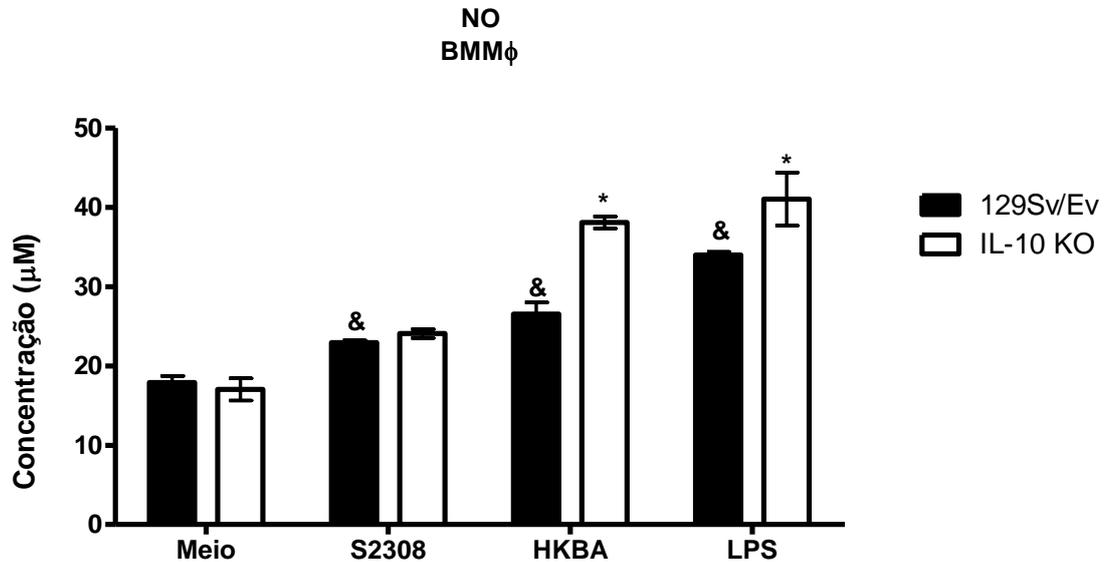


Figura 14: Produção de IL-12-p40 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e NO (D) por macrófagos derivados da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129Sv/Ev. Os macrófagos foram cultivados e estimulados com *B. abortus* (cepa virulenta S2308), bactéria morta pelo calor (HKBA) e LPS (agonista de TLR4). O meio é o controle negativo, não estimulado. As concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA, após 24 horas. O NO foi determinado pelo método colorimétrico de Greiss. (*) significativo em relação ao animal 129 Sv/Ev. (&) significativo em relação ao meio. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$.

B. abortus é um patógeno intracelular que sobrevive em células do sistema imune do hospedeiro, preferencialmente em macrófagos, apesar do aparente ambiente hostil provido por estas células (GOLDING *et al.*, 2001). Esta bactéria possui genes de virulência que são importantes na interação parasita-hospedeiro, e produzem fatores de virulência que modificam a fagocitose, a fusão fagolisossomo, a secreção de citocinas e a apoptose (MARIA-PILAR *et al.*, 2005). A resistência a patógenos intracelulares, como a *Brucella*, depende basicamente da resposta celular adquirida caracterizada pela ativação de linfócitos T e subsequente ativação e aumento do poder bactericida de macrófagos (ZHAN *et al.*, 1996).

A citocina TNF- α também está envolvida na resposta imune contra *B. abortus* atuando, principalmente, na ativação de macrófagos e indução da produção de óxido

nítrico (WANG *et al.*, 2001). Além disso, o TNF- α produzido pelos macrófagos tem a função de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio da infecção além de ativar essas células na tentativa de erradicar o microorganismo invasor. (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Estudos anteriores têm mostrado que TNF- α produzido por macrófagos em resposta a infecção com a *Brucella* atua de maneira autócrina aumentando a produção de IL-12 e conseqüentemente de IFN- γ que é requerido para o controle desta infecção (ZHAN & CHEERS, 1998).

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune inata a microorganismos intracelulares e é um indutor e essencial da imunidade adquirida do tipo Th1. As principais fontes de IL-12 são células dendríticas e macrófagos ativados (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

Outra citocina da imunidade natural é a IL-6. As principais fontes são os macrófagos, células endoteliais e células T. A IL-6 estimula a produção de neutrófilos por progenitores da medula óssea (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

Durante processos inflamatórios, macrófagos infectados são uma rica fonte de citocinas. No presente trabalho, macrófagos derivados da medula óssea de camundongos selvagens 129 Sv/Ev e IL-10 KO foram estimulados com as bactérias viva ou morta, observando-se aumento estatístico nas produções de TNF- α , IL-6, IL-12-p40 e NO apenas quando estimulados com HKBA, nos animais IL-10 KO comparados ao grupo controle 129 Sv/Ev. Pode-se avaliar a produção destes mediadores pela bactéria viva, porém não houve diferença entre os animais IL-10 KO em relação aos animais 129 Sv/Ev.

O processo de morte da bactéria ocorre em altas temperaturas (80°C), por uma hora e meia, havendo a homogeneização da alíquota a cada 15 minutos. Sendo assim, a estrutura da bactéria é desfeita e proteínas são desnaturadas. Porém, alguns componentes permanecem viáveis e podem ser os responsáveis por estimular a produção de algumas citocinas, as quais pela bactéria íntegra não estariam expostos. Este fato pode explicar a maior produção de algumas citocinas quando estimuladas com a bactéria morta pelo calor (HKBA).

7.2- *Brucella abortus* INDUZ A PRODUÇÃO DE CITOCINA ANTIINFLAMATÓRIA (IL-10) EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMM ϕ) DE CAMUNDONGOS SELVAGENS 129 Sv/Ev

Os macrófagos foram cultivados e estimulados *in vitro* com a *B. abortus* viva, morta pelo calor (HKBA) e LPS de *E. coli*. A concentração da IL-10 foi determinada por ELISA, após 24 horas de estimulação.

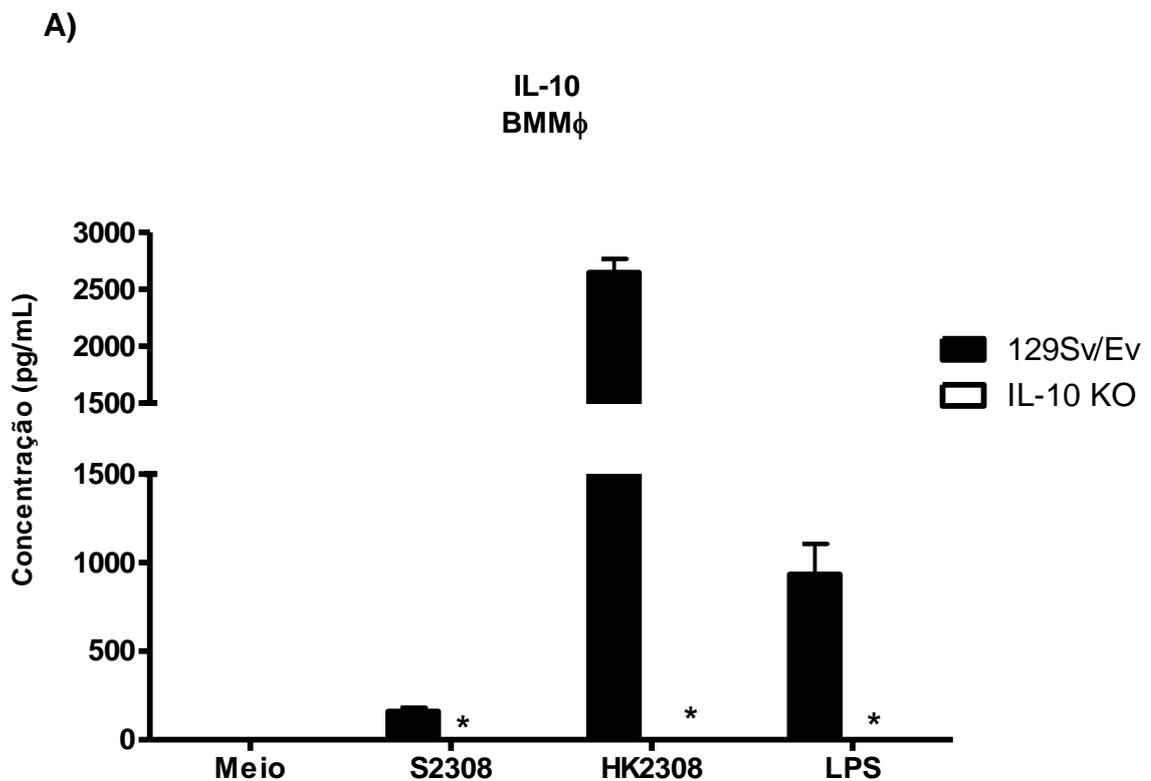


Figura 15: Produção de IL-10 (A) por macrófagos derivados da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev. Os macrófagos foram cultivados e estimulados com *B. abortus* (cepa virulenta S2308), bactéria morta pelo calor (HKBA) e LPS (agonista de TLR4). O meio é o controle negativo, não estimulado. A concentração da citocina foi determinada por ELISA, após 24 horas. (*) significativo em relação ao animal 129 Sv/Ev. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$.

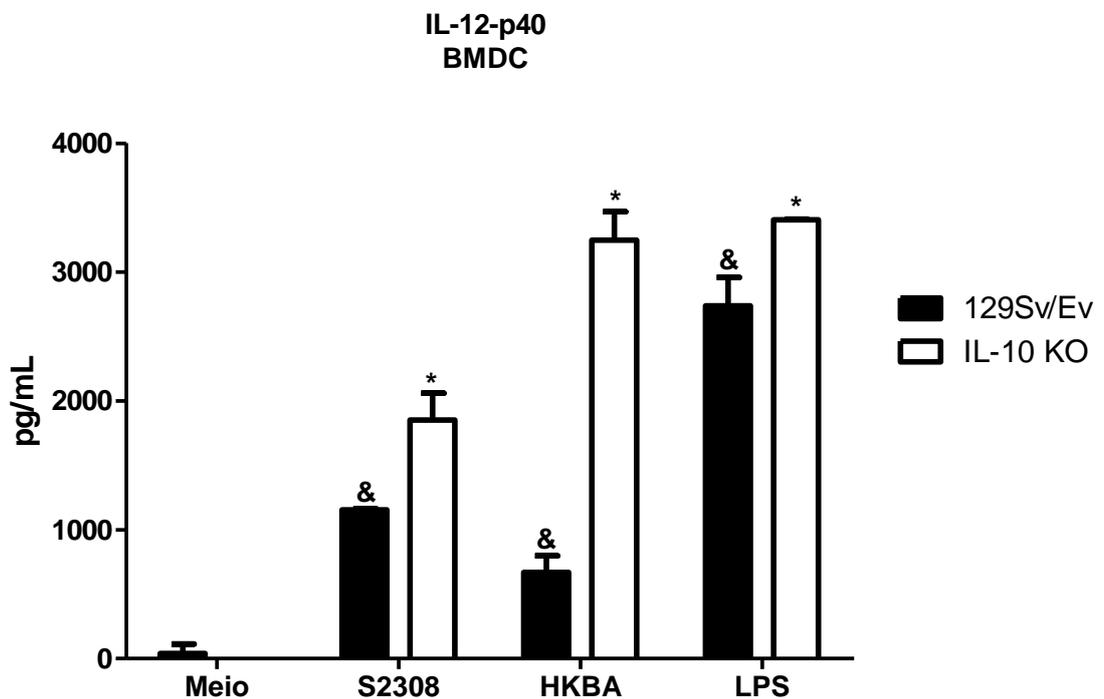
A IL-10 é uma importante citocina antiinflamatória do sistema imune, pode ser produzida por várias células como: células T tipo Th2, Treg, Th1, Th17, células T CD8+ e células B, células dendríticas, macrófagos, NK, eosinófilos e neutrófilos. Esta citocina atua inibindo macrófago, produção de NO, MHC de classe II, moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86), NK, mediadores inflamatórios como: IL-1 $\alpha\beta$, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF, TNF, algumas quimiocinas e PGE2.

Assim como demonstrado por Turner e colaboradores em 2002 que utilizaram *M. tuberculosis* como modelo de infecção, o processo inflamatório gerado pela bactéria *B. abortus*, ativa o sistema imunológico a produzir IL-10 buscando a regulação, homeostase e o controle da infecção. Este fator foi observado neste trabalho quando os animais 129 Sv/Ev foram capazes de produzir IL-10 quando estimulados pelas bactérias viva ou morta, demonstrando a busca pelo controle da infecção. Este resultado não foi encontrado nos animais IL-10 KO, devido ao processo de interrupção do gene produtor desta citocina.

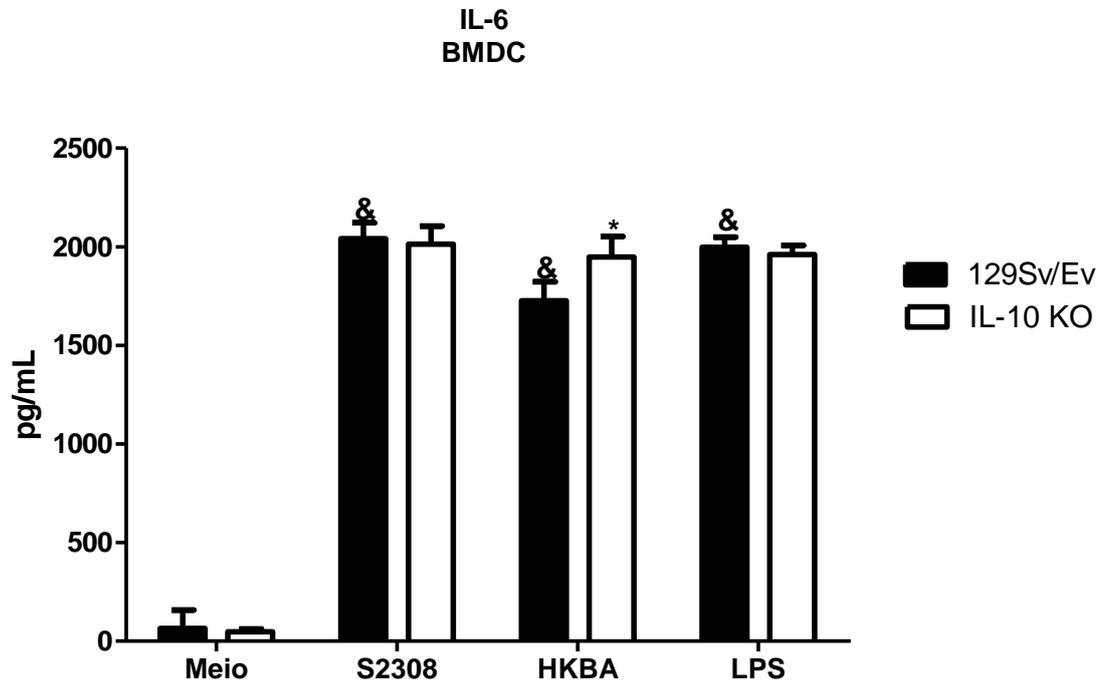
7.3- CÉLULAS DENDRÍTICAS PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS IL-10 KO ESTIMULADOS PELA *Brucella* PRODUZEM NÍVEIS MAIS ELEVADOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DO QUE AS CÉLULAS DERIVADAS DE ANIMAIS 129 Sv/Ev.

Células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO foram estimuladas e o sobrenadante desta cultura celular foi coletado com 24 horas para dosagem das citocinas por ELISA.

A)



B)



C)

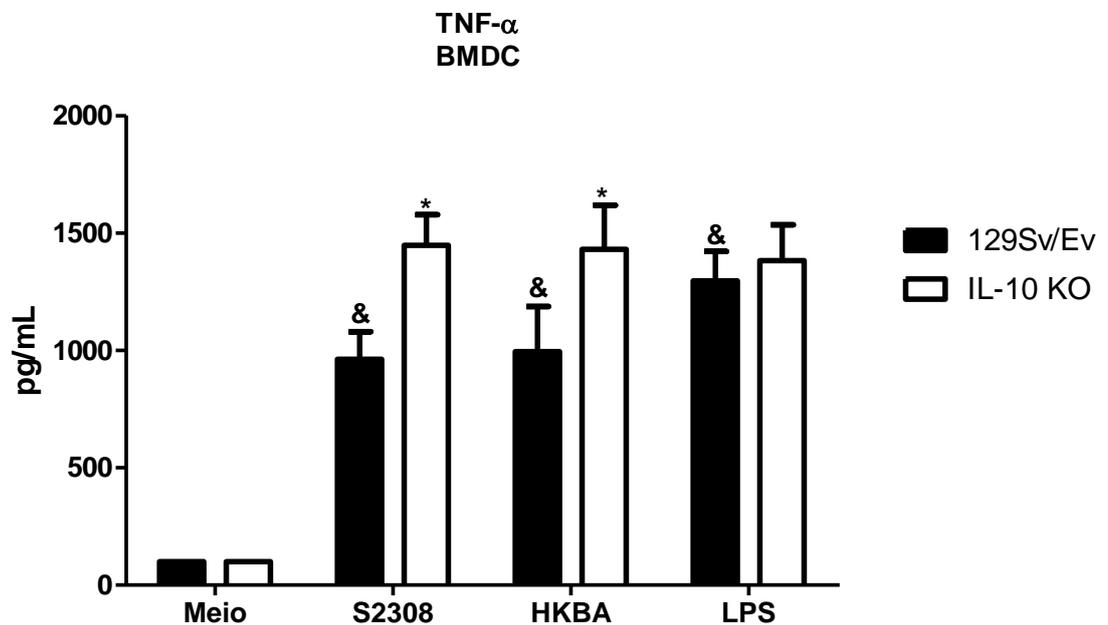


Figura 16: Produção de IL-12-p40 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) por dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev. As dendríticas foram cultivadas e estimuladas com *B. abortus* (cepa virulenta S2308), bactéria morta pelo calor (HKBA) e LPS (agonista de TLR4). (*) significativo em relação ao animal 129 Sv/Ev. (&) significativo em relação ao meio. Os resultados são referentes a 2 experimentos. (*) $p < 0,05$.

As células dendríticas (DC) são células apresentadoras profissionais, caracterizadas pela distinta habilidade de induzir respostas imunes primárias, por sua eficaz ativação de linfócitos T (BRUNA-ROMERO E RODRIGUEZ, 2001) As bactérias internalizadas são processadas e apresentadas aos linfócitos T desencadeando uma resposta imune adaptativa. As DC maduras migram dos órgãos periféricos para áreas de linfócitos T em órgãos linfóides. Conseqüentemente, ocorrem interações e ligações celulares que geram a produção de citocinas, como IL-12 que irão polarizar a resposta imune para o padrão Th1. A ativação das células dendríticas após infecções por *Brucella*, levam a secreção de IL-12, que tem função primordial na ativação de células NK e diferenciação de linfócitos T e B em células efetoras antígeno-específicas (HUANG *et al.*,2001).

O cultivo de células da medula óssea dos animais 129 Sv/Ev e IL-10 KO e diferenciação com meios ricos em GM-CSF levam a alterações dos aspectos morfológicos como aumento de tamanho e expansão dos prolongamentos, característicos de células dendríticas. Após esta diferenciação as células foram estimuladas e observa-se pelos resultados obtidos que as bactérias vivas e mortas foram capazes de induzir a alta produção de IL-12-p40 e TNF- α , em camundongos IL-10 KO quando comparadas com os animais selvagens 129 Sv/Ev. Porém, a produção da citocina IL-6 por células dendríticas apresentou diferença estatística apenas quando estimuladas com a HKBA.

7.4- *Brucella abortus* GERA A PRODUÇÃO DE IL-10 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS SELVAGENS 129 Sv/Ev

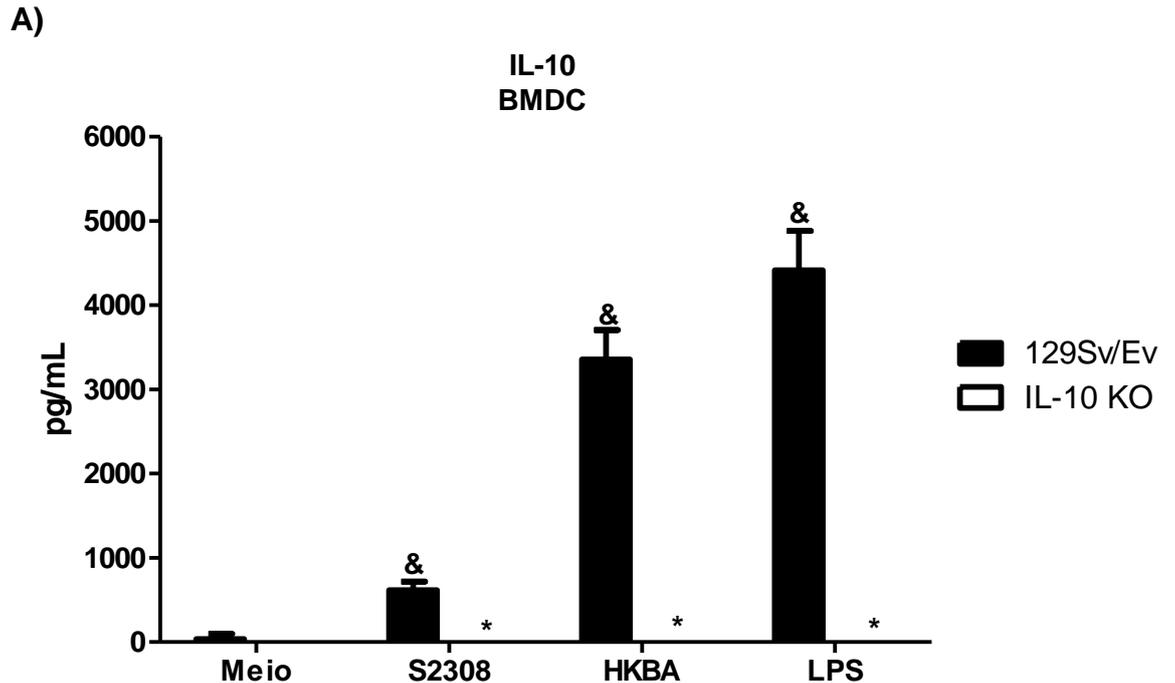


Figura 17: Produção de IL-10 (A) por dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos IL-10 KO e 129Sv/Ev. As dendríticas foram cultivadas e estimuladas com *B. abortus* (cepa virulenta S2308), bactéria morta pelo calor (HKBA) e LPS (agonista de TLR4). O meio é o controle negativo, não estimulado. A concentração da citocina foi determinada por ELISA, após 24 horas. (*) significativo em relação ao animal 129 Sv/Ev. (&) significativo em relação ao meio. Os resultados são referentes a 2 experimentos. (*) $p < 0,05$.

Corroborando com o resultado observado em macrófagos, a IL-10 também é produzida em células dendríticas derivadas da medula óssea de animias 129 Sv/Ev, quando estimulada com a *Brucella* viva ou morta pelo calor. A produção de IL-10 está associada ao controle da inflamação induzida por esta infecção. Como célula apresentadora de antígeno, as DC são muito eficientes na indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e também antiinflamatórias, como nos animais 129 Sv/Ev. A ausência da síntese de IL-10 nos camundongos IL-10 KO deve-se na interrupção do gene que codifica a IL-10 possibilitando assim, a avaliação mais precisa do papel desta citocina na regulação imune.

7.5- OS CAMUNDONGOS IL-10 KNOCKOUT SÃO MAIS RESISTENTES À INFECÇÃO POR *Brucella abortus*

Os camundongos IL-10 knockout (KO) apresentaram maior resistência à bactéria *B. abortus*, cepa virulenta S2308, após 1, 2, 3, 6 e 14 semanas de infecção, quando comparados aos camundongos selvagens 129 Sv/Ev.

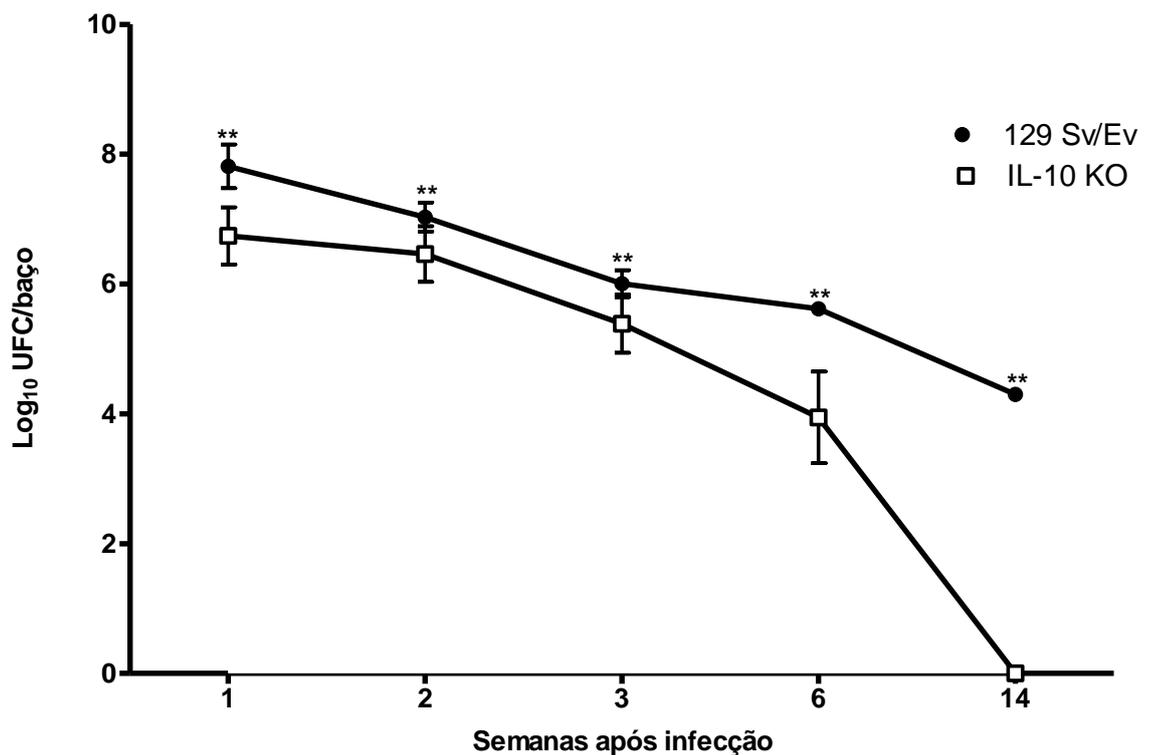


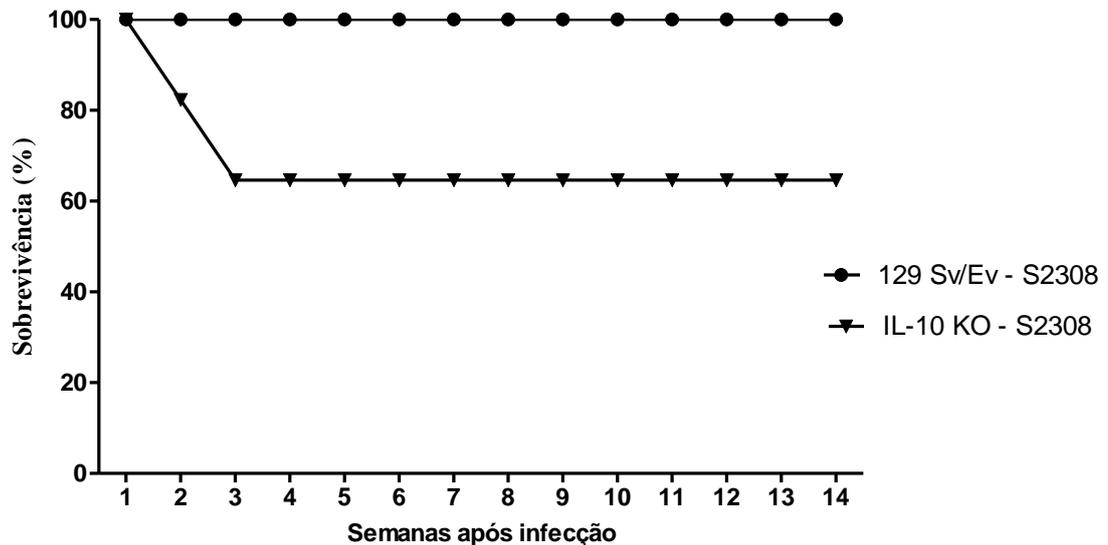
Figura 18: Camundongos IL-10 KO tem um aumento na capacidade de controlar a infecção por *Brucella abortus* em todos os tempos de infecção. Camundongos IL-10 KO (n=5) e 129 Sv/Ev (n=5) foram infectados intraperitonealmente com 10⁶ bactérias e 1, 2, 3, 6 e 14 semanas após a infecção e o título de *B. abortus* foi analisado no baço desses animais sendo apresentados em log de UFC. Os dados representam 4 experimentos independentes. (**) P<0.001 em relação ao camundongo selvagem 129 Sv/Ev.

Esta característica de diminuição na recuperação da bactéria, também foi observada por Fernandes e Baldwin (1995), através da neutralização da IL-10 endógena pela administração de anticorpos monoclonais anti-IL-10. Embora haja semelhança com o nosso resultado, os dados de Fernandes e Baldwin (1995) só

avaliou o intervalo de 1 semana após a infecção. Além disso, a citocina foi neutralizada por anticorpos monoclonais já no presente trabalho demonstramos o papel desta citocina utilizando camundongos com a deleção do gene produtor da IL-10. Também foi realizada uma cinética de infecção com 1, 2, 3, 6 e 14 semanas, para avaliar melhor o curso da infecção. O resultado obtido demonstrou a maior eficiência no controle da infecção pela bactéria *Brucella abortus* em camundongos IL-10 KO, comparados aos animais 129 Sv/Ev. Embora este fator tenha sido observado em todos os tempos da cinética nos animais IL-10 KO intensifica-se com 14 semanas levando ao controle da infecção.

7.6- CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE IL-10 KO E 129 Sv/Ev APÓS À INFECÇÃO PELA BACTÉRIA *B. abortus*

A)



B)

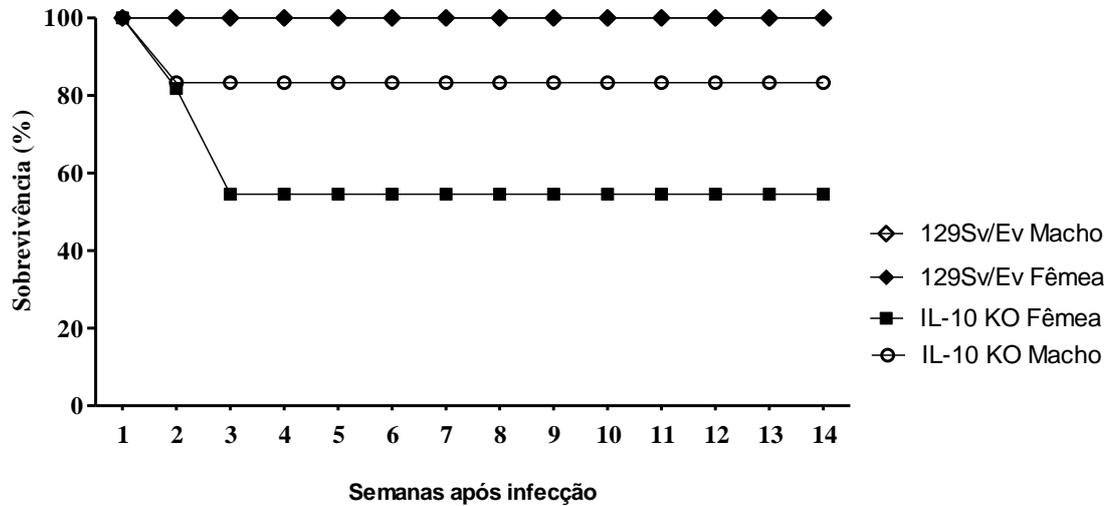


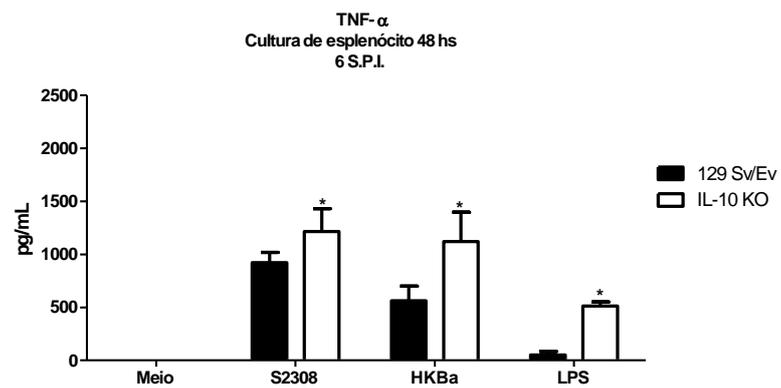
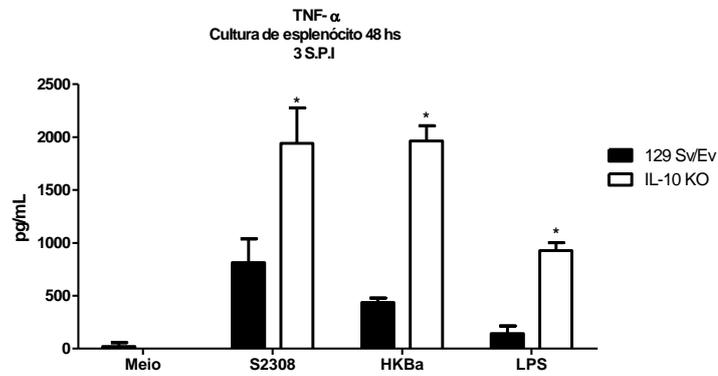
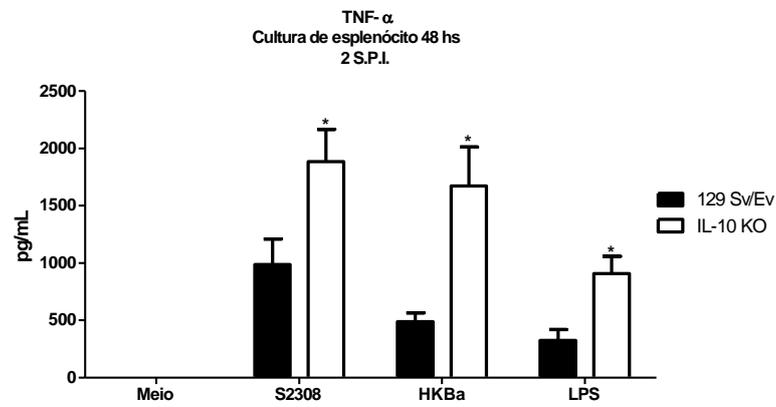
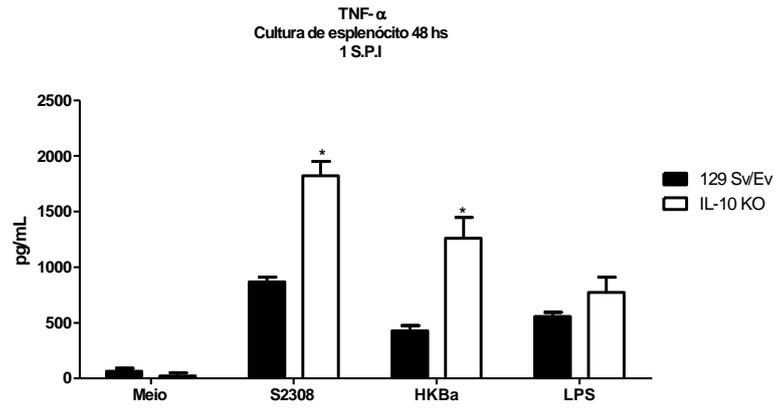
Figura 19: Curva de sobrevivência dos camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev (A) e porcentagem de sobrevivência entre machos e fêmeas (B). Camundongos IL-10 KO (n=17) e 129 Sv/Ev (n=17) foram infectados intraperitonealmente com 10^6 bactérias sendo mantidos e observados durante as semanas. Os dados representam 2 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$.

Os camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev, foram infectados com 1×10^6 bactérias com 7 semanas de vida, pela via intraperitoneal. Em contrapartida, utilizou-se salina estéril para os grupos controles, mantendo a homogeneidade do experimento. Os animais foram mantidos em observação para avaliação da sobrevivência, durante 14 dias. As mortes ocorreram apenas nos camundongos IL-10 KO iniciando na segunda semana após a infecção. Também foram observadas mortes, na terceira semana após a infecção neste mesmo grupo de animais, totalizando aproximadamente 35%. De forma bem interessante, este processo de morte não foi contínuo e os animais sobreviveram após estas três semanas cruciais de desafio. Entretanto, Hart *et al.*, 2011 observaram um resultado diferente, onde os animais bloqueados para o receptor de IL-10 em modelo murino de câncer ovariano, não sobreviveram mais que 70 dias de vida. Os resultados encontrados com *Brucella abortus* sugerem que a ausência desta citocina não se torna necessária para a sobrevivência, porém pode interferir nas

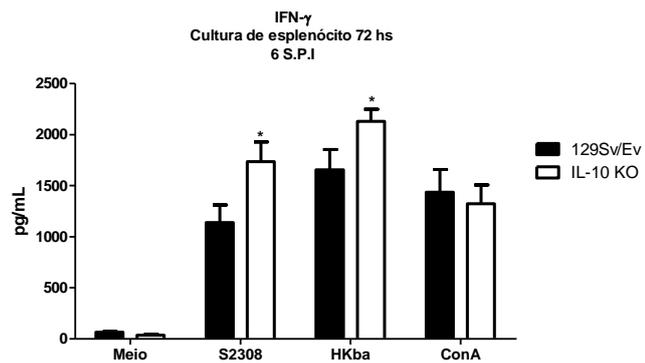
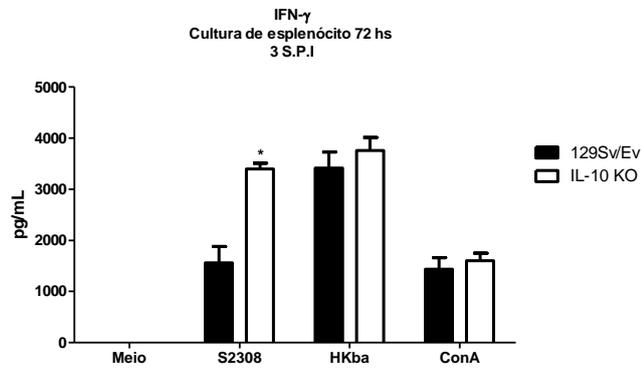
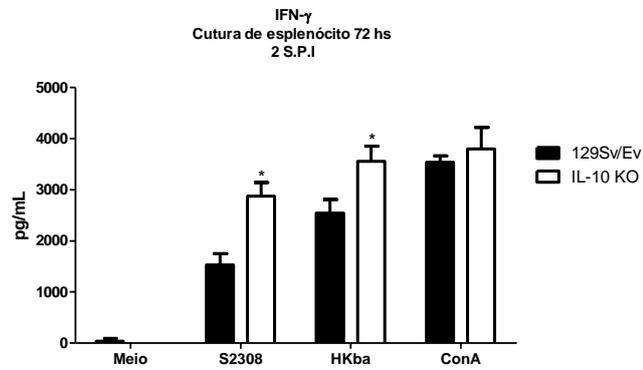
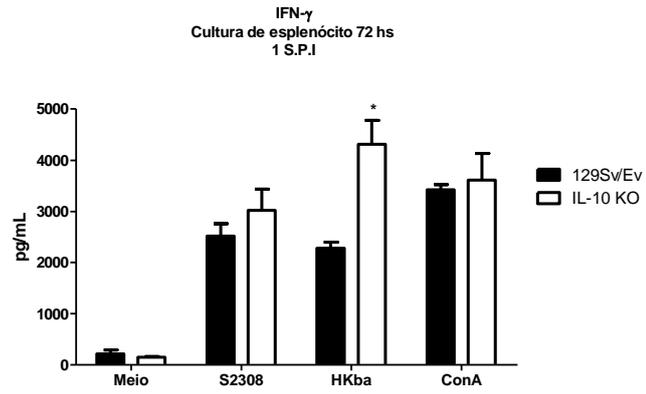
semanas iniciais do processo infeccioso. Outra característica observada foi a maior prevalência de mortes em fêmeas, 45,45% em relação aos animais machos 16,67%, dentro do mesmo grupo de camundongos IL-10 KO e na mesma etapa da infecção, ou seja, com 2 e 3 semanas após a infecção. Possivelmente algum fator hormonal esteja envolvido ou mesmo outros mecanismos ainda não esclarecidos e que devam ser mais bem elucidados.

7.7- ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS IL-10 KO INFECTADOS PELA *B. abortus* PRODUZEM MAIS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DO QUE CÉLULAS DE ANIMAIS 129 Sv/Ev.

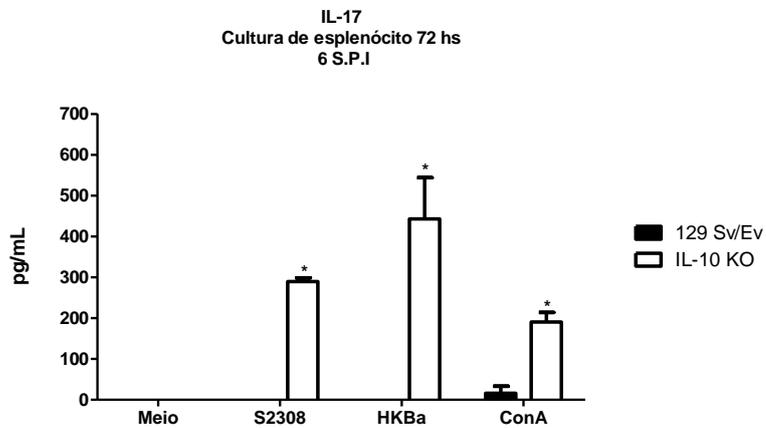
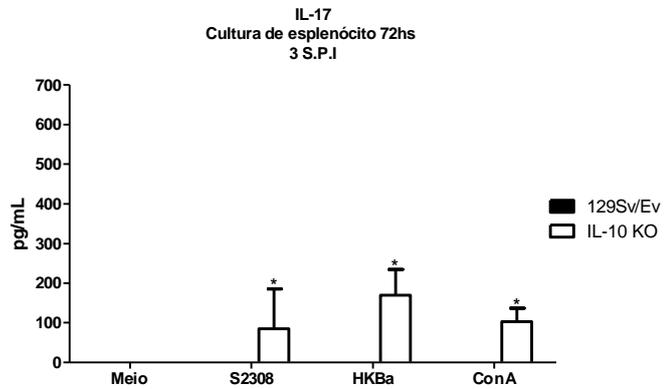
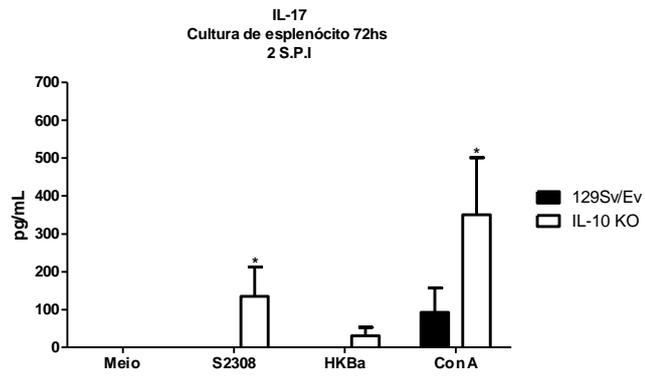
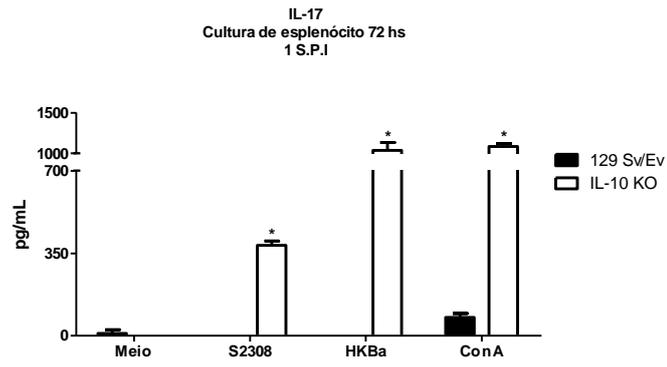
A produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , está associada ao controle da infecção por *Brucella abortus* (JIANG *et al.*, 1993; MURPHY *et al.*, 2001). Dessa maneira, células do baço de animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev foram retiradas, preparadas e plaqueadas como descrito na metodologia deste trabalho. Os esplenócitos foram estimulados com *B. abortus* viva, HKBA, LPS ou ConA. O sobrenadante desta cultura foi coletado com 48 e 72 horas para análise das citocinas por ELISA. A citocina IL-4 também foi dosada, porém não foi possível detectá-la, demonstrando que a infecção pela *B. abortus* não induz uma resposta característica Th2.



A)



B)



C)

Figura 20: Produção de TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-17 (C) de esplenócitos dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO. Cultura de células do baço de animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev estimulados com *B. abortus* (cepa virulenta S2308), bactéria morta pelo calor (HKBA), LPS ou ConA. O meio é o controle negativo, não estimulado. As concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA, após 48 ou 72 horas de estimulação, durante uma cinética de 1, 2, 3 e 6 semanas após infecção. Os valores em pg/ml foram alterados de acordo com a produção, para serem melhores visualizados em todos os tempos da cinética. (*) significativo em relação ao 129 Sv/Ev. (&) significativo em relação ao meio. Os dados representam 3 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$.

A indução de uma resposta imune do tipo Th1 é considerada como a resposta celular mais importante no controle da infecção por *Brucella abortus*. Dentre as citocinas envolvidas IL-12 é chave no direcionamento de uma resposta Th1, culminando com a produção de IFN- γ . O controle da brucelose murina é dependente da indução de IFN- γ , e TNF- α tem papel crucial na eliminação da *Brucella* presente em macrófagos (ZHAN *et al.*, 1996). Como já mencionado IFN- γ é uma citocina diretamente envolvida neste processo e de fundamental importância no controle da brucelose murina (KO *et al.*, 2002). Tendo em vista a crucial importância de IFN- γ para o controle desta infecção avaliamos a sua secreção em cultivo de células do baço durante uma cinética de infecção. Sendo assim, observamos que tanto a bactéria viva ou morta foi capaz de induzir doses mais elevadas de IFN- γ nos animais IL-10 KO do que no grupo selvagem 129 Sv/Ev. Este resultado corrobora com o trabalho de Fernandes e Baldwin, (1995), que observaram a capacidade da IL-10 em regular negativamente a produção de IFN- γ , em infecções pela *B. abortus*. Diante do exposto, pode-se sugerir que uma maior produção de IFN- γ esta associada à eliminação da bactéria de forma mais eficaz pelos animais IL-10 KO, já que a citocina mais importante para o controle desta infecção encontra-se altamente secretada em toda a cinética.

Também importante para o controle da infecção é a citocina TNF- α . A secreção desta é sabidamente importante para eliminar o patógeno. Sendo assim, foi possível observar ao longo de toda a cinética o aumento nos níveis de produção de TNF- α nos animais IL-10 KO em relação aos 129 Sv/EV,

corroborando com uma maior resistência à infecção observada em camundongos IL-10 KO.

A citocina pró-inflamatória IL-17 tem sido reportada em processos inflamatórios em humanos e camundongos. Células T tipo Th17 produzem abundantes citocinas inflamatórias e são mediadoras chave na defesa do hospedeiro, desordens inflamatórias e doenças autoimunes (KORN *et al.*, 2009). Mecanismos de interação entre células Treg e Th17 (Figura 21), e a habilidade paradoxal de células Treg em aumentar a indução de IL-17A, ainda não são muito bem entendidos *in vivo* (VELDHOEN *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2007). Pandiyan *et al.*, 2011 demonstraram de acordo com a biologia celular da Treg que elas podem promover a diferenciação de células Th17 e participam da imunidade protetora do hospedeiro, contra a infecção fúngica *C. albicans*.

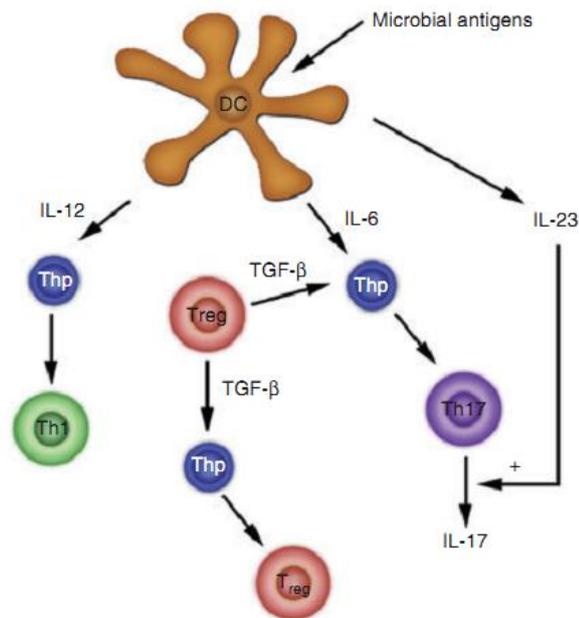
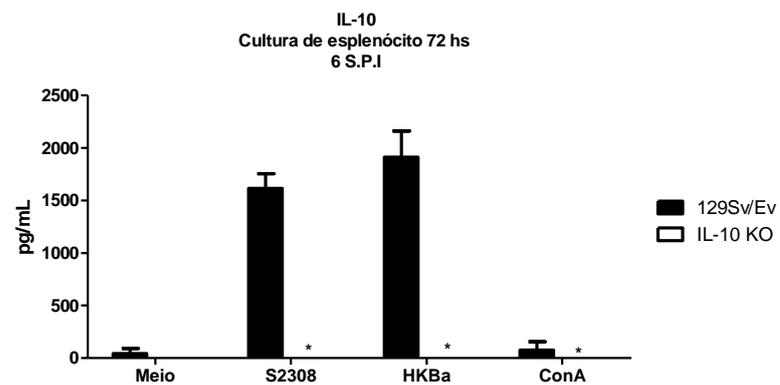
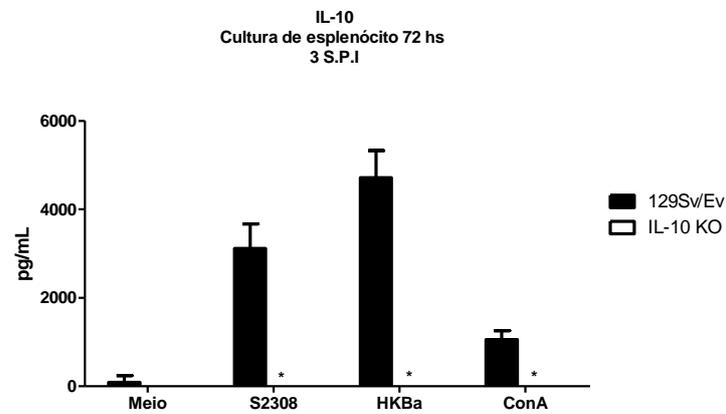
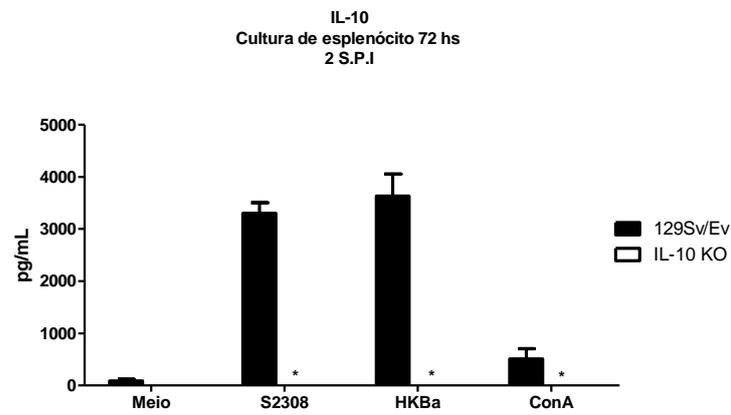
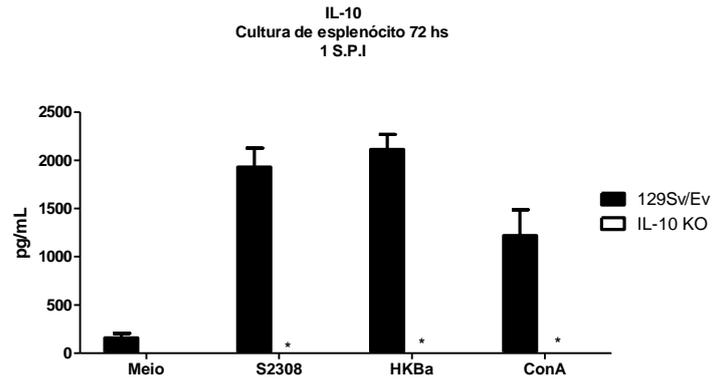


Figura 21: Células T helper (Th) concomitantes com Th1, Th17 e Treg, juntamente com a produção de TGF-β por Treg na indução fenotípica Th17. Clinical and Experimental Immunology, 2007.

Surpreendentemente neste trabalho com a *B. abortus* observou-se a produção de IL-17 restrita aos animais IL-10 KO (Figura 20 C). Possivelmente, este fator se deva a regulação exercida pela IL-10 em animais 129 Sv/Ev. Como os animais IL-10 KO não produzem a citocina IL-10, observa-se o aumento de IL-17. Suportando essa idéia, nos camundongos 129 Sv/Ev este fenótipo é invertido. Em camundongos 129 Sv/Ev que produzem a citocina IL-10, como demonstrado na figura 20 C, é possível que esta citocina tenha um controle da produção de IL-17 uma vez que não foi observada a produção desta citocina na cultura de esplenócitos deste animal. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Wilson *et al.*, 2011, com animais C57BL/6, demonstrando ausência de IL-17 A em cultura de células do baço de animais infectados pelo *S. mansoni*. Apesar de demonstrar que possivelmente há uma relação na regulação negativa entre os perfis de produção de IL-10 e IL-17, mais estudos devem ser feitos para aprofundar a relação de controle de produção destas citocinas pelas células de camundongos infectados com *B. abortus*.

7.8- *B. abortus* TEM A CAPACIDADE DE PRODUZIR IL-10 EM ANIMAIS 129 Sv/Ev DURANTE TODAS AS SEMANAS ANALISADAS



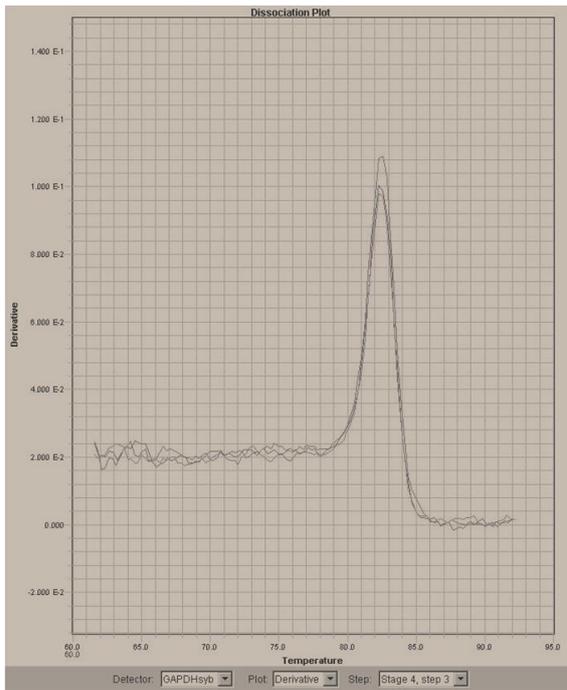
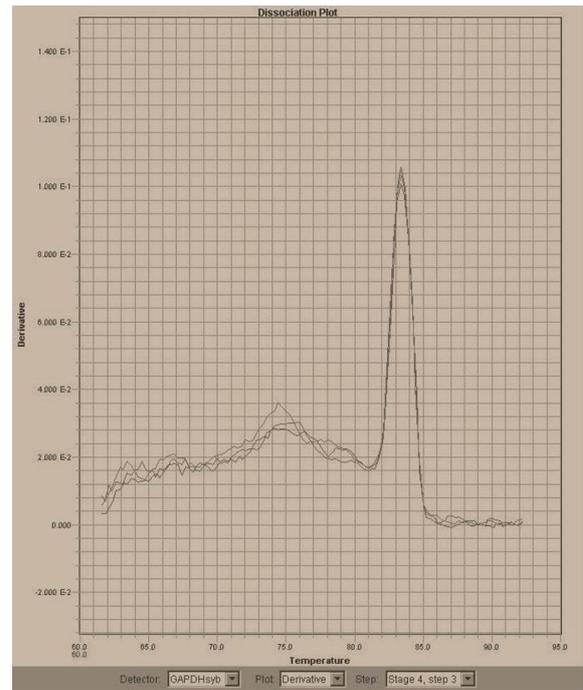
A)

Figura 22: Produção de IL-10 (A) de esplenócitos dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO. Cultura de células do baço de animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev estimulados com *B. abortus* (cepa virulenta S2308), bactéria morta pelo calor (HKBA), LPS ou ConA. O meio é o controle negativo, não estimulado. As concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA, após 48 ou 72 horas de estimulação, durante uma cinética de 1, 2, 3 e 6 semanas após infecção. (*) significativo em relação ao 129 Sv/Ev. (&) significativo em relação ao meio. Os dados representam 3 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$.

IL-10 é reconhecida por ser produzida em camundongos em resposta à imunização com a bactéria *B. abortus*, morta pelo calor cepa 19 (SVETIC *et al.*, 1993). A citocina IL-10 é conhecida por afetar a produção de citocinas Th1, incluindo IFN- γ , pela atividade na capacidade de apresentação de antígeno do macrófago (FIORENTINO *et al.*, 1991).. Diante do exposto observamos neste trabalho que a bactéria viva ou morta foi capaz de induzir a produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de células do baço dos animais 129 Sv/Ev, em todos os tempos da cinética. Este resultado está concordante com os demais encontrados com as culturas de células dos macrófagos e dendríticas.

7.9- *Brucella abortus* INDUZ A EXPRESSÃO DE TGF- β IN VITRO

A)

 β -ACTINA**TGF- β** 

B)

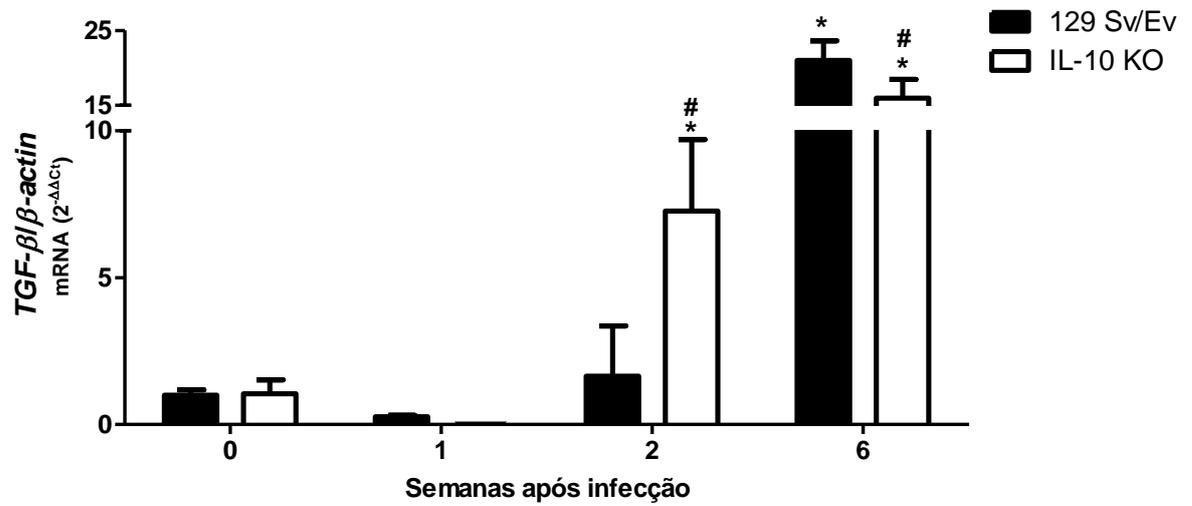


Figura 24: Curva de dissociação (A) e produção de *TGF-β* (B) da cultura de esplenócitos de camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO. Cultura de células do baço de animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev foram estimulados com a bactéria viva (tempo 1, 2 e 6 semanas após infecção) ou não estimulados (tempo 0). Os valores foram normalizados utilizando como controle endógeno a *β-Actina* e como calibrador o valor de ΔCt das amostras do tempo 0. O RNA total foi extraído após 72 horas de estimulação referentes à cinética de 1, 2 e 6 semanas após infecção. (*) significativo em relação ao tempo zero (sem estímulo) (#) significativo em relação ao 129 Sv/Ev. Os dados são referentes a 1 experimento. (*) $p < 0,05$.

Para analisar a especificidade dos iniciadores da reação de PCR em tempo real, uma etapa a mais à reação foi adicionada. Esta etapa chamada de curva de dissociação permite realizar um controle de amplificações inespecíficas. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presente em cada reação, devido a diferenças de T_m (temperatura de dissociação), entre produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada um. Os gráficos da Figura 19 A demonstram que somente um produto de amplificação foi gerado nas reações em que se utilizou o iniciador específico para *TGF-β* ou para *β-actina*. A curva de dissociação de *TGF-β* demonstra um único pico de queda de fluorescência a 83,5°C, enquanto o pico de queda de fluorescência de *β-actina* ocorre a 82,5°C. Este resultado permite identificar que os produtos amplificados foram específicos e a não presença de outros picos garante qualidade nas análises feitas da quantificação relativa de *TGF-β*.

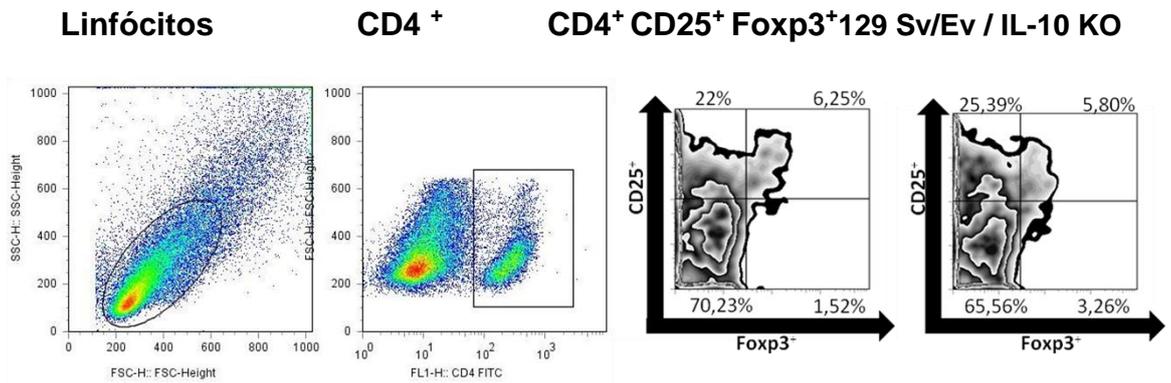
A citocina Fator de Crescimento Transformador- β (*TGF-β*) é produzida por células T, macrófagos, dendríticas e outros tipos celulares. Alguns estudos em camundongos indicam que a diferenciação ou sobrevivência das células T reguladoras depende em parte de *TGF-β*. Além disso, *TGF-β* produzido por células T reguladoras, ou, talvez, pelas células dendríticas, pode bloquear o desenvolvimento dos subconjuntos Th1 e Th2 de células T CD4⁺ efetoras.

Adicionalmente, TGF- β em combinação com citocinas evocadas durante respostas imunes naturais, como IL-6, pode promover a diferenciação de um subconjunto pró-inflamatório de células T CD4⁺ que secretam IL-17 (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008). Esta característica também foi citada por Saraiva e O'Garra, 2010 expondo a combinação das citocinas TGF- β , IL-6, IL-21, e ou IL-27 na indução de células perfil Th17 a produzir IL-10.

Observou-se nos resultados expostos neste trabalho que a expressão de TGF- β pela bactéria viva foi crescente nos animais IL-10 KO a partir da 2ª semana de infecção. Este resultado de crescente expressão também foi encontrado nos animais 129 Sv/Ev. De forma curiosa, observou-se uma queda na produção de IL-17 na segunda semana após a infecção nos animais IL-10 KO, podendo não estar relacionado com ao aumento inicial na expressão de TGF- β . , neste tempo inicial de infecção. Também pode haver alguma relação com a secreção de IL-6 em células dendríticas e macrófagos, porém em tempos mais tardios. Adicionalmente ao aumento da produção de IL-17 na sexta semana após a infecção, observa-se o aumento na expressão de TGF- β , sugerindo a ligação desta citocina ou outros fatores, na potencialização do retorno da produção de IL-17 nesta 6ª semana. Porém, deve haver estudos mais aprofundados no assunto para consolidar esta hipótese.

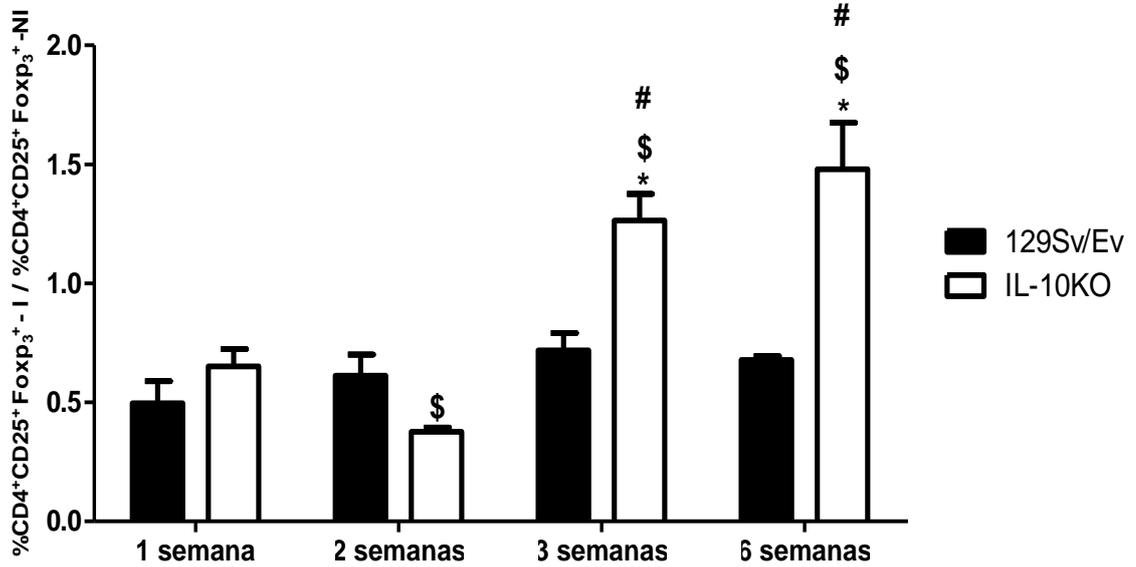
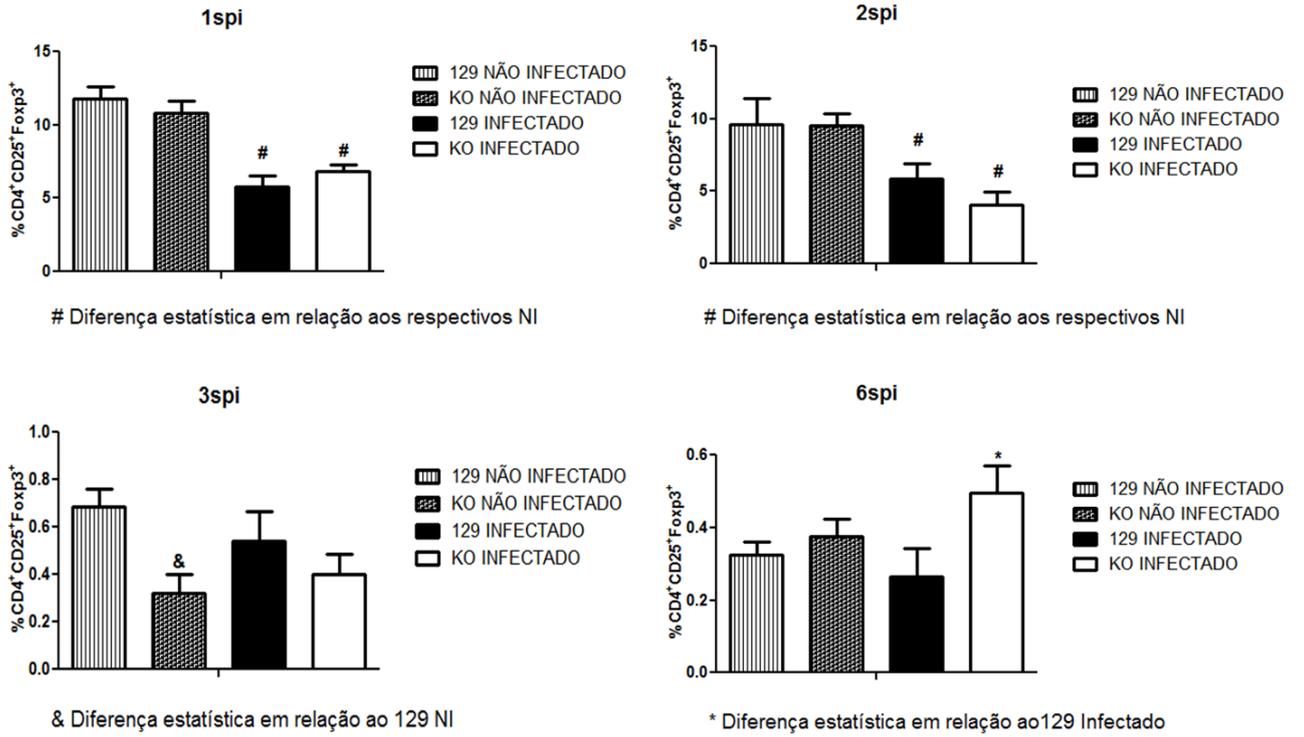
7.10- *B. abortus* LEVA AO AUMENTO NA PRODUÇÃO DE iTreg NOS ANIMAIS IL-10 KO

A)



As células do baço de camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev infectados ou não foram cultivadas, plaqueadas (1×10^6) e marcadas respectivamente com anticorpos anti-CD4, CD25 e Foxp3, para avaliação da produção de células Treg. Conforme observada na figura 20 A os Gates foram selecionados delimitando a população de linfócitos e posteriormente as células CD4 e CD25 Foxp3, ambos positivos para estas células. Foram utilizados controles de isotipo, marcações individuais para determinar os parâmetros necessários para a análise e controle de marcação inespecífica pela Streptavidina.

B)



\$Diferença estatística em relação ao KO 1spi
 #Diferença estatística em relação ao KO 2spi
 *Diferença estatística em relação ao 129Sv/Ev

Figura-25 Delineamento experimental da análise de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ por citometria de fluxo (A) e avaliação da razão na produção de células Treg induzida por Treg naturais (B) em camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO. Cultura de células do baço de animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev infectados com *Brucella abortus* (I) ou não infectados (NI) foram plaqueados e marcados para células Treg, durante 1, 2, 3 e 6 semanas após infecção. (*) significativo em relação ao 129 Sv/Ev. (#) diferença estatística em relação ao animal IL-10 KO 2 semana após infecção. (\$) diferença em relação ao camundongo IL-10 KO da 1 semana após infecção. Os dados representam 3 experimentos independentes. (*) p<0,05.

As células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ denominadas células T regulatórias (Treg) são linhagens celulares estáveis que possuem papel de atividade supressora na manutenção de tolerância das moléculas próprias do hospedeiro (*self*), e na manutenção da homeostase do sistema imune (Sakaguchi et al., 2009; Pandiyan et al., 2011). Sendo assim, para efeito de nomenclatura dessas células e um melhor entendimento dos resultados aqui demonstrados, faz-se necessário definir a diferença entre as células Treg naturais e as células Treg induzidas. As células Treg naturais possuem o efeito supressor basicamente mediado pelo contato células-à-célula, mas não podendo-se excluir o envolvimento de citocinas na ativação deste efeito supressor (Maloy et al., 2003). Além da função de controle de doenças auto-imunes, as Tregs naturais também estão envolvidas na imunidade aos tumores, tolerância aos transplantes, nos mecanismos alérgicos e também na manutenção da tolerância à microbiota intestinal (Sakaguchi, 2004). Já as Tregs induzidas dizem respeito à resposta que altera a imunidade do hospedeiro após um processo infeccioso ou alteração da homeostase e/ou na tolerância a microrganismos ou moléculas imunoestimulatórias (*non-self*). O resultado apresentado na figura 25 B demonstra a porcentagem das células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) presente no baço de animais infectados com *B. abortus* (Tregs induzidas pela infecção), relativa à porcentagem das células Treg presente em baço de camundongos não infectados (Tregs naturais).

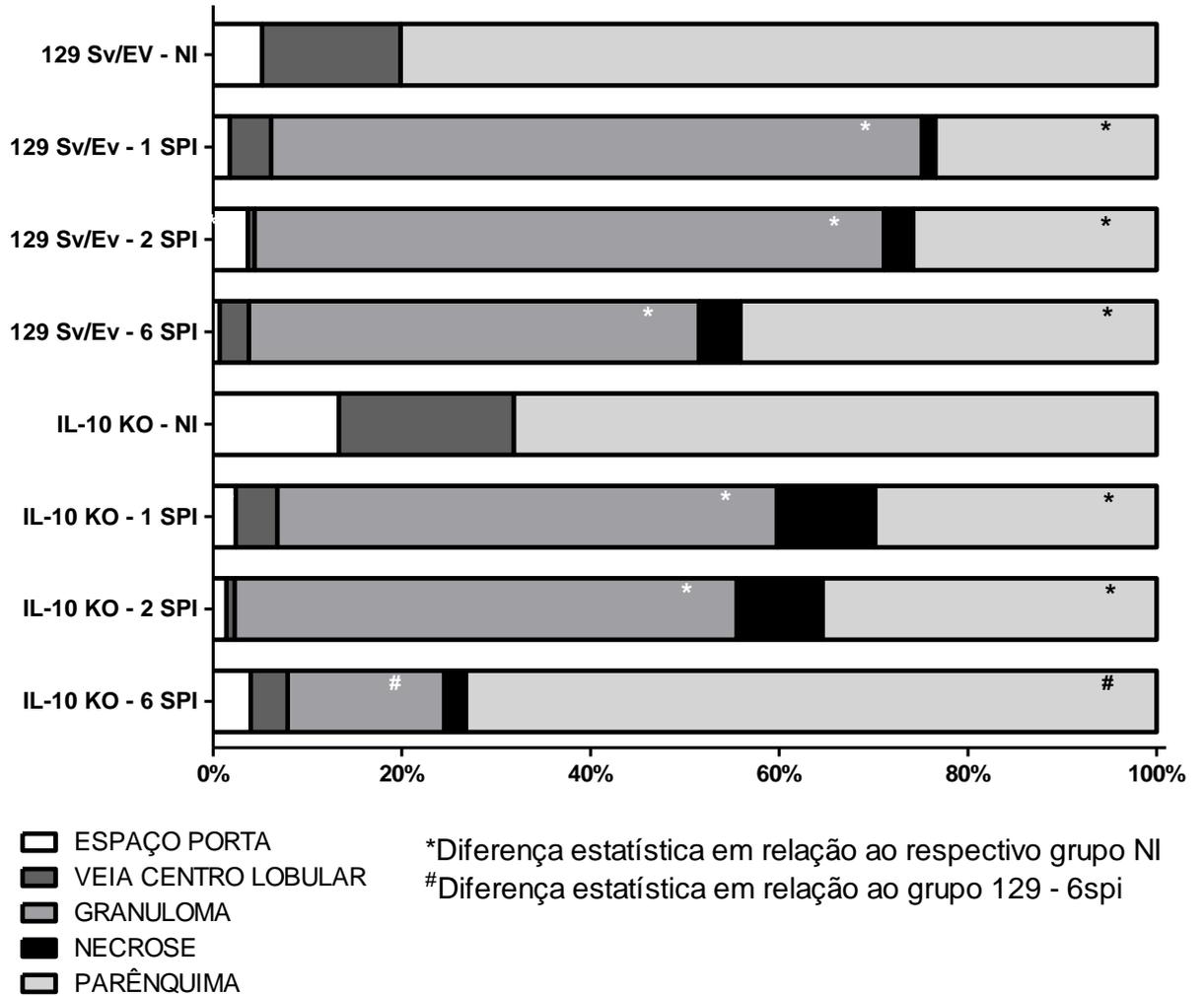
De acordo com os resultados obtidos a porcentagem de células Treg induzidas em razão das células Treg naturais, demonstrou que houve um aumento gradativo desta população de células nos animais IL-10 KO, durante toda a cinética, tornando-se estatisticamente aumentada a partir da 3ª semana após a infecção. Entretanto nos animais selvagens 129 Sv/Ev esta porcentagem de células permanece constante ao longo da cinética de infecção.

Apesar dos receptores do tipo Toll (TLRs) serem mais estudados em nível da ativação de células apresentadoras de antígenos, tais receptores também podem modular de maneira direta a função linfócitos T (Komai-Koma et al., 2004; LaRosa et al., 2007). Recentemente, novos estudos vêm demonstrando que os TLRs podem modular a função de Tregs diretamente (Caramalho et al., 2003; Netea et al., 2004; Crellin et al., 2005; Liu et al., 2006; Forward et al. 2010). A infecção por *Candida albicans* induz a sinalização de TLR2 a promover a sobrevivência de células Tregs culminando com o aumento da expressão de IL-10 e acarretando nos efeitos supressores da resposta inflamatória gerada pelo patógeno (Netea et al., 2004). Já o reconhecimento de LPS bacteriano por TLR4 induz a proliferação e a sobrevivência de Tregs aumentando sua atividade imunossupressora (Caramalho et al., 2003). A sinalização mediada por TLR5 ao reconhecer flagelina não induz a proliferação de Tregs, mas induz o aumento da expressão de Foxp3 (Crellin et al., 2005). E mais recentemente, Forward e colaboradores (2010) ao estudar o papel dos agonistas de TLR7, confirmou os resultados obtidos por Caramalho et al., 2003, onde foi demonstrado que a presença de TLR7 está relacionada com o aumento da população de células CD4⁺CD25⁺ e a estimulação de células com agonistas deste receptor aumentou a capacidade imunossupressora dessas células.

Assim como no caso da infecção por *C. albicans*, TLR2 é um importante receptor da imunidade inata capaz de reconhecer a bactéria *B. abortus* e mediar uma sinalização intracelular para um controle efetivo deste patógeno (Oliveira et al., 2008). Giambartolomei e colaboradores (2004) demonstraram que além de induzir uma série de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-12, a proteína de membrana externa lipídada omp-19 é capaz de induzir a secreção da citocina antiinflamatória IL-10 dependente da sinalização mediada por TLR2. A indução de IL-10 também foi demonstrada por RT-PCR semi-quantitativo em células THP-

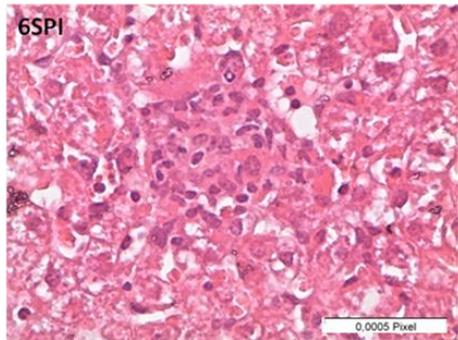
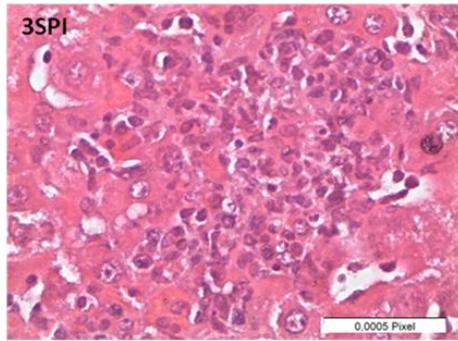
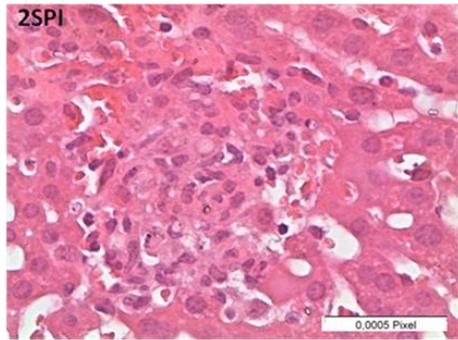
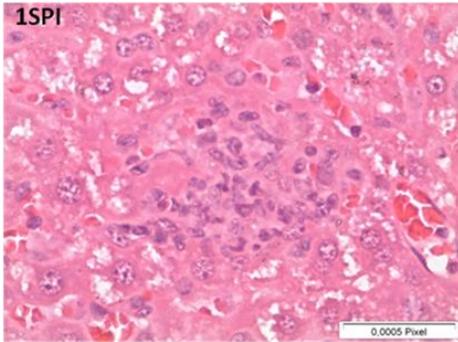
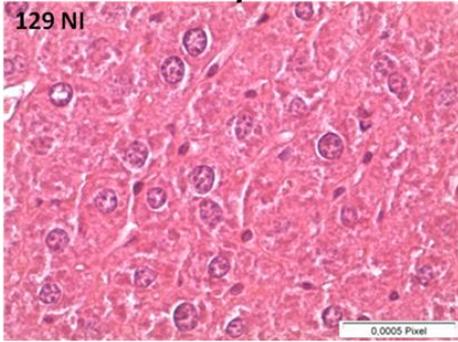
1 infectadas por *B. suis* (Dornand et al., 2002). Tais evidências corroboram os resultados obtidos neste trabalho, onde, tanto a bactéria viva e, de maneira mais proeminente, a bactéria morta pelo calor foram capazes de induzir a secreção de IL-10 na cultura de esplenócitos de camundongos 129 Sv/Ev (Figura 23 A). Talvez, a bactéria morta pelo calor esteja expondo algum componente, como as proteínas de membrana externa lipidadas, para que possam ser reconhecidas por TLR2, por exemplo, e manter a sobrevivência das Tregs e aumentar a secreção de IL-10 nos camundongos 129 Sv/Ev durante o processo de infecção por *B. abortus*. Ademais, a indução das células Treg para se tornarem fenotipicamente produtoras de IL-10 e possuir características imunossupressoras está diretamente relacionada à estimulação dessas células por TGF- β (Maynard et al., 2007). Em contrapartida, camundongos deficientes para IL-10 endógena (IL-10 KO) apresentaram aumento gradativo das células Treg durante toda a cinética de infecção provavelmente devido à falta da expressão de IL-10. A falta da expressão de IL-10 pelas células Treg acarreta na falta de um componente importante para um controle da proliferação destas células, o quê explicaria a maior quantidade relativa de células regulatórias presente no baço de camundongos deficientes para a produção de IL-10 infectados com *B. abortus* quando comparadas à quantidade de Tregs no baço de camundongos 129 Sv/Ev (Figura XX). Além disso, uma possibilidade, não muito bem entendida ainda, demonstra que células T naive ou células Treg podem, ao serem estimuladas com TGF- β , induzir a expressão de um padrão fenotípico Th17 induzindo a expressão e a secreção de IL-17A (citado por Saraiva e O'Garra, 2010). Tal possibilidade está de acordo com o resultado de IL-17 no sobrenadante de esplenócitos dos camundongos analisados neste trabalho (Figura 22 C). Células de camundongos 129 Sv/Ev não foram capazes de secretar IL17, contudo ocorreu secreção desta citocina no sobrenadante de esplenócitos derivados de camundongos IL-10 KO. A falta de IL-10, ao não determinar um controle de proliferação das células Treg, sugere que há a possibilidade de que ao serem estimulados por TGF- β , passem a apresentar um perfil Th17. Contudo, é necessário mais experimentos para um maior aprofundamento do entendimento dos mecanismos que controlam a proliferação das células Treg e do papel de TGF- β na diferenciação destas células para um perfil Th17 na infecção por *B. abortus*.

7.11- CAMUNDONGOS IL-10 KO APRESENTAM MELHOR CAPACIDADE DE CONTROLAR A INFECÇÃO PELA *B. abortus*

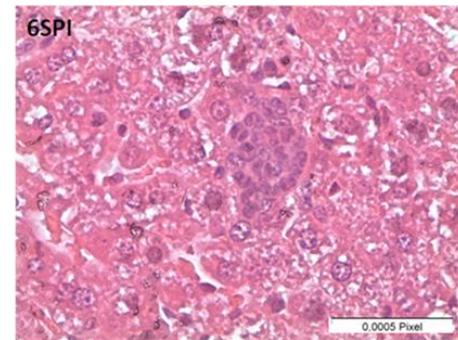
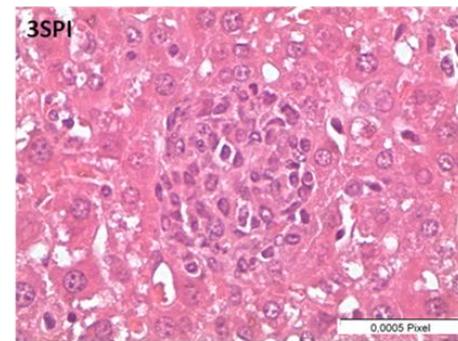
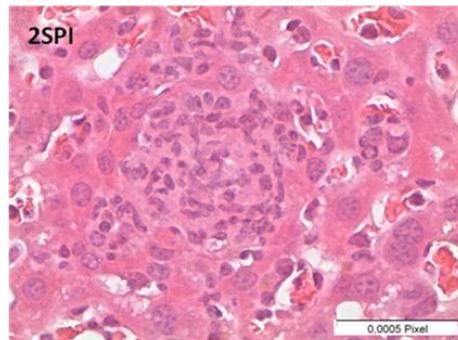
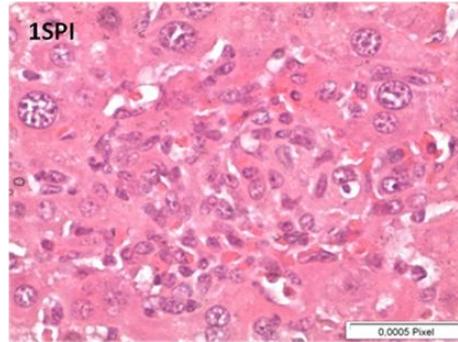
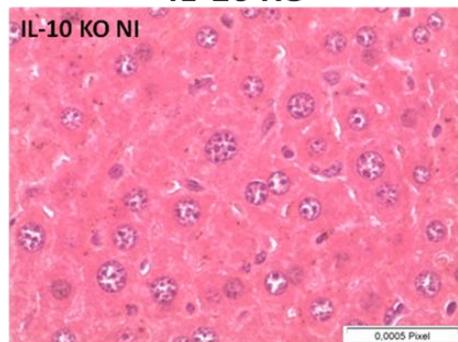


A)

129 Sv/Ev



IL-10 KO



B)

Figura-26 Análise histopatológica do Fígado dos camundongos 129 Sv/Ev e IL-10 KO (A) e imagens das lâminas (objetiva de 40x) referentes aos mesmos animais. Fígado dos camundongos IL-10 KO (n=5) e 129 Sv/Ev (n=5) infectados com *Brucella abortus* (I) ou não infectados (NI) foram preparados e corados com HE. As lâminas foram analisadas através de uma ocular dividida em quadrantes (gratícula), sendo contadas 5 descrições histológicas x 5 animais por grupo x 10 contagens na gratícula/lâmina, ou seja, total de 250 imagens/lâmina, pelo microscópio óptico, na objetiva de 10x. Os tempos avaliados foram de 1, 2 e 6 semanas após infecção (A). Os valores passaram pela transformação angular para análise estatística conforme os demais resultados e apresentados em %. (B) imagens representativas dos granulomas dos animais IL-10 KO e 129 Sv/Ev da cinética de 1, 2, 3 e 6 semanas após a infecção, na objetiva de 40x do microscópio óptico Olympus CX 3, microcâmara Olympus U/CMAD 3, SC300. (*) significativo em relação ao grupo não infectado. (#) diferença estatística em relação ao animal 129 Sv/Ev da 6ª semana após a infecção. Os dados são referentes a 2 experimentos distintos. (*) p<0,05.

As infecções pela bactéria *B. abortus* estão associadas com a formação de lesões granulomatosas focais no baço, fígado e tecido linfóide de humanos e roedores, iniciando-se com 2 a 3 semanas após a infecção (ENRIGHT *et al.*, 1990; FABYAN *et al.*, 1912). Rolán *et al.*, 2009 demonstraram a formação de microgranulomas nos baços dos camundongos C57BL/6 e Igh6^{-/-} infectados pela *B. abortus* selvagem, sendo associado a diminuição da proporção volumétrica do folículo linfóide. De acordo com Bogliolo, 2000 as lesões granulomatosas são contituidas por linfócitos, macrófagos, células epitelioides e células inflamatórias gigantes, havendo diferença nos casos de tuberculose por não apresentarem necrose caseosa e bacilos, sendo então denominadas de granulomas epitelióides.

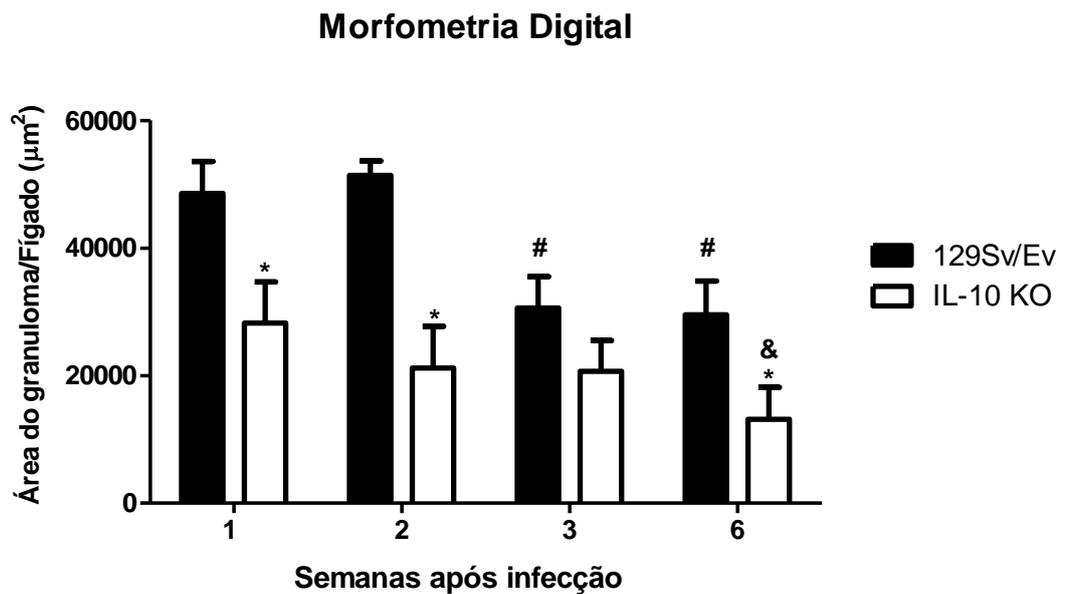
Devido a presença de lesões inflamatórias nesta infecção, o presente trabalho buscou avaliar estas alterações em animais ausentes para uma citocina antiinflamatória. Interessantemente, foram observados nos fígados dos camundongos IL-10 KO uma queda mais eficiente de granulomas e necroses, durante toda a cinética de infecção, sendo intensificada a partir da 6ª semana após a infecção, comparados aos camundongos 129 Sv/Ev. Este resultado foi concordante com a maior diminuição nas UFC nos animais IL-10 KO durante toda a cinética. Além disso, estes animais tiveram uma melhor recuperação do

parenquima hepático, em relação aos camundongos selvagens 129 Sv/Ev. Este fator também foi observado nas imagens da lâminas, onde os granulomas são visualizados menores ao longo da infecção nos animais IL-10 KO em relação aos 129 Sv/Ev. Os camundongos IL-10 KO apresentaram menos infiltrado inflamatório e granulomas visivelmente menores, na 6ª semana após a infecção.

Abbas, Lichtman e Pillai, 2008 relataram a importância da citocina TGF- β na regulação da reparação tecidual, depois que as reações imunológicas ou inflamatórias locais regridem. Esta avaliação sugere concordância com o aumento na expressão de TGF- β na 2ª e 6ª semanas após a infecção nos animais IL-10 KO e o evidente reparo tecidual do parênquima hepático. Contudo o retorno da homeostase tecidual possivelmente levaria a diminuição da expressão desta citocina. Adicionalmente, a maior correlação destes resultados apresenta-se de forma evidente na diminuição do número de bactérias levando conseqüentemente a diminuição do processo inflamatório granulomatoso e por conseguinte ao retorno do parênquima hepático.

7.12- CAMUNDONGOS IL-10 KO APRESENTAM MENOR ÁREA DE GRANULOMA

A)



* Diferença estatística em relação ao 129

Diferença estatística dentro do grupo 129 em relação ao 129 1

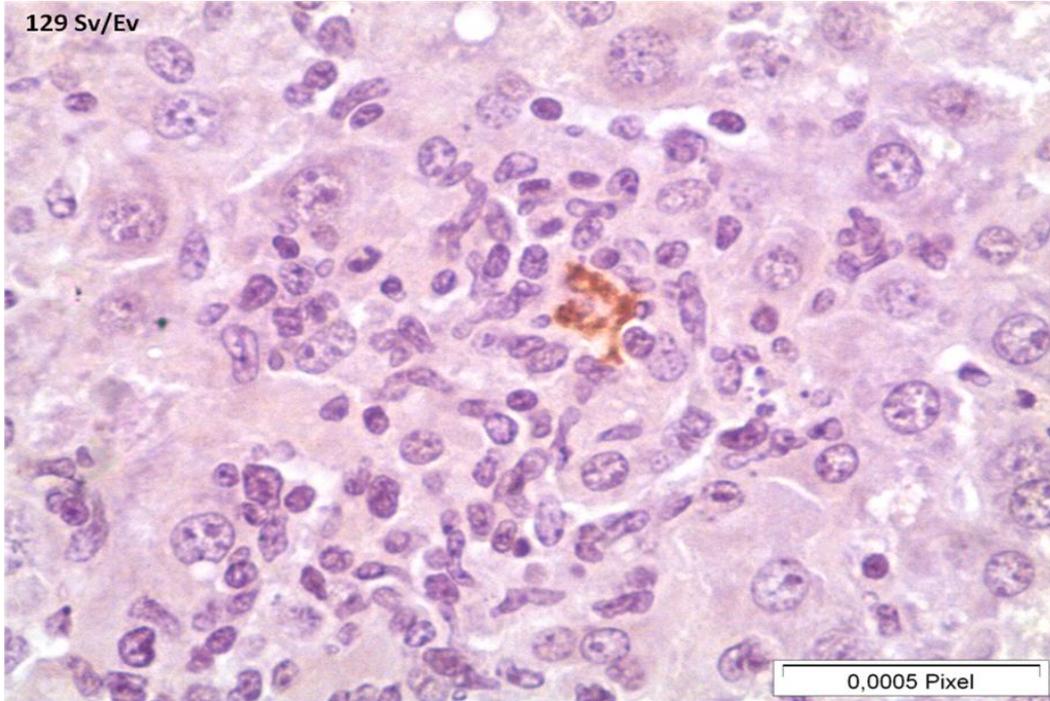
& Diferença estatística dentro do grupo KO em relação ao IL-10 KO 1

Figura 27: Morfometria digital para análise da área do granuloma do fígado de camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev. Fígado dos camundongos IL-10 KO (n=5) e 129 Sv/Ev (n=5) infectados com *Brucella abortus* e corados com HE, foram capturados 30 imagens de granulomas/lâmina na objetiva de 40x, pelo microscópio óptico Olympus CX 31 microcâmara Olympus U/CMAD 3, SC 300 e a áreas dos granulomas foram analisadas pelo programa KS300 em μm^2 durante 1, 2, 3 e 6 semanas após a infecção. (*) diferença estatística em relação ao camundongo 129 Sv/Ev. (&) diferença estatística dentro do grupo KO em relação ao IL-10 KO da 1ª semana após a infecção. (#) diferença estatística dentro do grupo 129 Sv/Ev em relação ao animal 129 Sv/Ev da 1ª semana após a infecção. Os resultados representam 1 experimento. (*) $p < 0,05$.

Adicionalmente ao resultado anterior e corroborando com o mesmo, foram observadas semelhanças no granuloma dos camundongos IL-10 KO em relação ao animal 129 Sv/Ev durante toda a cinética de infecção. A área dos granulomas em μm^2 foi gradativamente menor intensificando na 6^a semana após a infecção, comparado aos animais selvagens 129 Sv/Ev. Este resultado deve-se a diminuição no número de bactérias encontradas nos animais IL-10 KO. Contudo os animais 129 Sv/Ev também apresentaram queda na área do granuloma, porém este fato é mais bem evidenciado nos camundongos IL-10 KO.

7.13- *B. abortus* EVIDENCIADA NOS GRANULOMAS HEPÁTICOS

A)



B)

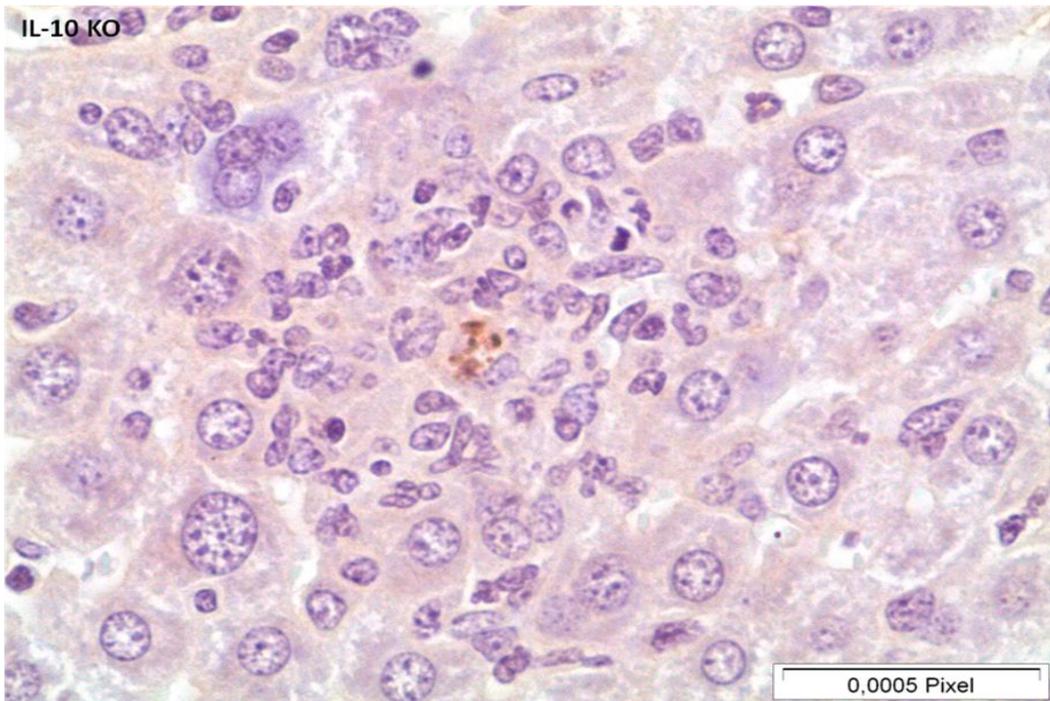


Figura-28 Imunohistoquímica para marcar a *B. abortus* dentro das limitações dos granulomas em camundongos 129 Sv/Ev (A) e IL-10 KO (B).

Fígado dos camundongos IL-10 KO (n=5) e 129 Sv/Ev (n=5) infectados com *Brucella abortus* e corados com HE, foram marcados com anticorpos anti-coelho - *B. abortus* B19 (vacinal) por imunohistoquímica durante 1, 2, 3 e 6 semanas após a infecção. O resultado representa a 1ª semana após a infecção. As imagens foram capturadas na objetiva de 40x. Os resultados representam 1 experimento.

Este resultado evidencia a imunomarcção da bactéria *B. abortus* nas limitações das lesões granulomatosas presentes nos camundongos IL-10 KO e 129 Sv/Ev. A marcação da bactéria no granuloma sugere à relação da bactéria a existência da lesão granulomatosa.

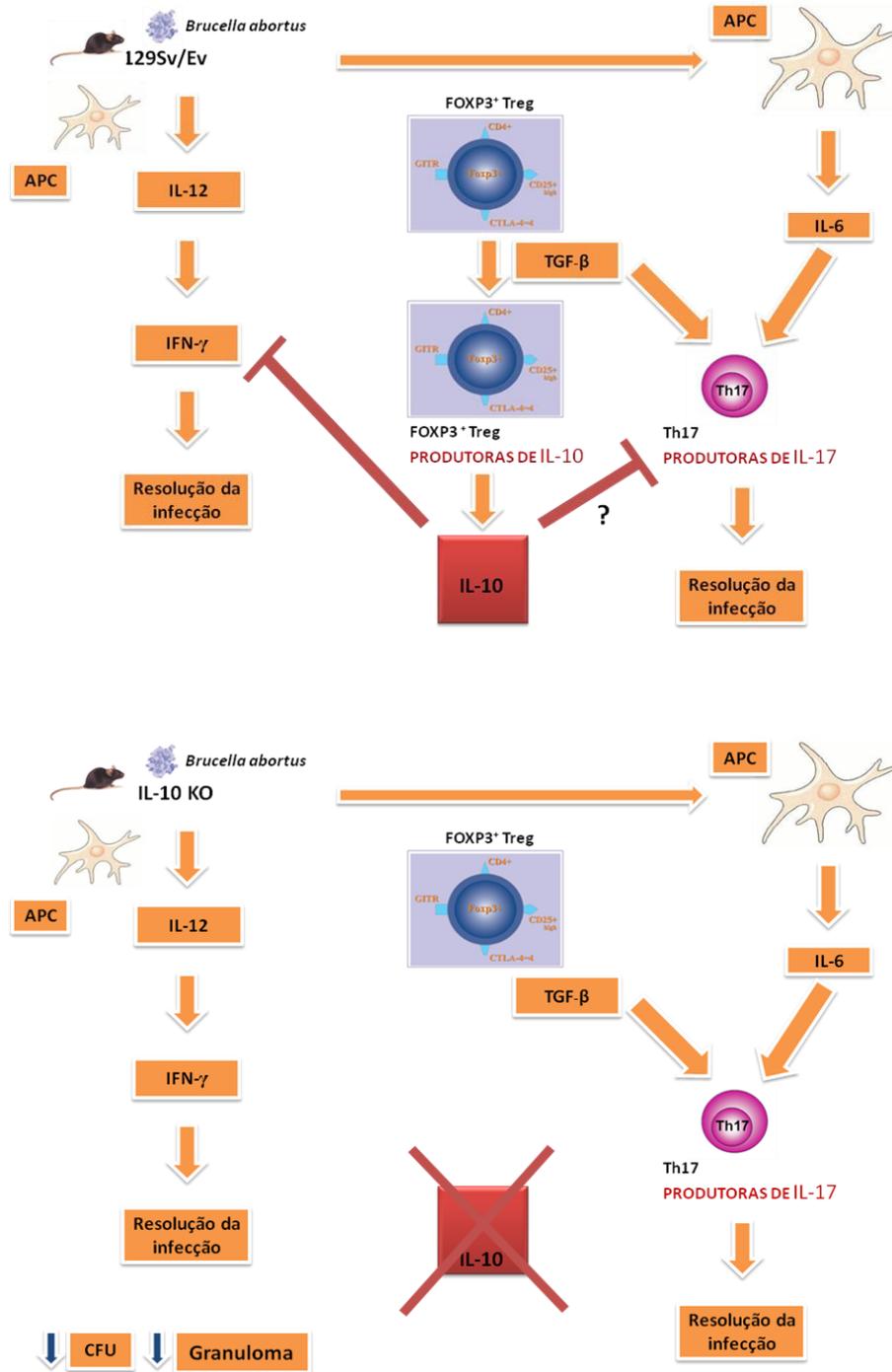


Figura 29: Modelo proposto de regulação do sistema imune na ausência IL-10 no combate efetivo da infecção causada pela bactéria *B. abortus*.

Quando a bactéria *B. abortus* infecta o hospedeiro a citocina IL-10 é requerida para o controle do processo inflamatório. Células apresentadoras de antígeno secretam citocinas e induzem fenótipos celulares. O perfil Th1 é ativado secretando citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , importantes para o combate desta infecção. Sabidamente a IL-10 controla negativamente a produção de IFN- γ , na busca da homeostase como no caso de finalização da infecção. Entretanto, na ausência da IL-10, outro fenótipo celular como TH17 é ativado buscando a produção de citocinas pró-inflamatórias de forma mais efetiva e potencializada. Dessa forma, ocorre a eliminação do patógeno, diminuição do granuloma e o retorno da homeostase do sistema imune do hospedeiro.

8- CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho suportam que a ausência da produção da IL-10 acarreta na indução de uma maior resistência à infecção pela bactéria *B. abortus* em modelo murino, através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias culminando com uma maior eliminação da bactéria e uma resolução mais rápida da patologia tecidual do hospedeiro levando, assim, a um controle mais efetivo da infecção.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; PURPHY, K.M.; SHER, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**. **383**, p.787-793.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A, H., PILLAI, S., 2008. *Imunologia Celular e Molecular*. **Elsevier Editora Ltda, 6ª edição**.

AKIRA, S.; TAKEDA, K., 2004. Toll-Like receptors signaling. **Nature Reviews**. **v.4**, p.499-511.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. . 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*. **INRA**, Paris.

ALTON, G. G. *Brucella melitensis*. In Nielsen, K. H.; Duncan, J. R. 1990. **Animal brucellosis**. Boca Raton: p.383-422.

ANUALPEC: Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & **Agroinformativos**., 2003. p. 400.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia., 2009. **v. 61**, supl.1, p.1-141.

BEAMER, G. L., FLAHERTY, D. K., ASSOGBA, B. D., STROMBERG, P., GONZALEZ-JUARRERO, M., DE WAAL MALEFYT R., et al. 2008. Interleukin-10 promotes Mycobacterium tuberculosis disease progression in CBA/J mice. **J. Immunol** **181.**, 5545-50.

BOURHIS, L. L. C. WERTS, 2007. Role of Nods in bacterial infection, *Microbes* **Infect.** **9**, 629e636.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): **Manual técnico**. Brasília, 2006. 184p.

BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A. et al. 1997. Humam exposure to Brucella recovered from a sea mammal. **Vet. Rec.**, **v.144**, p.483.

BRIGHTBILL, H.D.; PLEVY, S.E.; MODLIN, R.L.; SMALE, S.T. 2000. A proeminent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. **Journal of Immunology, Bethesda**, **v.164**, p.1940-1951.

CAPASSO, L. Bactéria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **J. Infect.**, **v.45**, p.122-127, 2002.

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**, **v.1**. Baltimore (MD): Willian and Wilkins, p.377-388.

CRAWFORD, R. M., HELBER, J. D. and BRUCE, S., 1990. Epidemiology and surveillance. In: K. Nielsen & J. R. DUNCAN. **Animal Brucellosis**. CRC Press. P131-152.

DAVID S. WEISS., KIYOSHI TAKEDA., SHIZUO AKIRA., ARTURO ZYCHLINSKY., e EDGARDO MORENO, 2005. MyD88, but Not Toll-Like Receptors 4 and 2, Is Required for Efficient Clearance of *Brucella abortus* **Infection and Immunity**, August, p. 5137-5143, **Vol. 73**

DE B. K., STAUFFER L., KOYLASS M. S., et al. 2008. Characterization of a novel *Brucella* strain (BOI) associated with a prosthetic breast implant infection. **J. Clin. Microbiol.**, **v.46**, p.43-49.

DUMOUTIER, L.; RENAULD, J.C. 2002. Viral and cellular interleukin-10 (IL-10)-related cytokines: from structures to functions. **European Cytokine Network, Montrouge**, **v.13**, n.1, p.5-15.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; TESCH, H.; GALLAGHER, G. 1997a. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics, Heidelberg**, **v.46(2)**, p.120-128.

ESKDALE, J.; WORDSWORTH, P.; BOWMAN, S.; FIELD, M.; GALLAGHER, G. 1997b. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and lupus erythematosus. **Tissue Antigens, Copenhagen**, **v.49**, n.6, p.635-639.

FANG, I.M.; LIN, C.P.; YANG, C.H.; CHIANG, B.L.; YANG, C.M.; CHAU, L.V.; CHEN, M.S. 2005. Inhibition of experimental autoimmune anterior uveitis by adenovirus-mediated transfer of the interleukin-10 gene. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics. New York**, v.21, n.6, p.420-428.

FERNADES, D, M; BALDWIN, C, L. 1995. Interleukin-10 Downregulates Protective Immunity to *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, p. 1130-1133.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSSMANN, T.R. 1989. Two types of mouse helper T cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **Journal of Experimental Medicine, New York**, v.170, p.2081-2095.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; et al. 2007. *Brucella ceti* sp. Nov. And *Brucella pinnipedialis* sp. Nov. For *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.57, n.11, p.2688-2693.

FRANCO, M. P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; et al. 2007. Human brucellosis. **Lancet Infect. Diseases**, v.7, n.12, p.775-786.

MACEDO, G, C., MAGNANI, D, M., CARVALHO, N, B., BRUNA-ROMERO, O., GAZZINELLI, R, T., e OLIVEIRA, S, C., 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

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Vet. Res., v.36**, p.313-326.

GODFROID F, CLOECKAERT A, TAMINIAU B, DANESE I, TIBOR A, DE BOLLE X, MERTENS P, LETESSON JJ. 2000. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of brucella melitensis 16M (wbk). **Res Microbiol. Oct;151(8):655-68**

GOLDING B, SCOTT DE, SCHARF O, HUANG LY, ZAITSEVA M, LAPHAM C, ELLER N, GOLDING H. 2001Immunity and protection against Brucella abortus. **Microbes Infect.**Jan;3(1):43-8. Review.

GORVEL, J. P., MORENO, E. 2002. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet. Microbiol, v. 90**, p.281-297.

HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; et al 2005. Completion of the genome sequence of Brucella abortus and comparison to the highly similar genomes of Brucella melitensis and Brucella suis. **J. Bacteriol., v.187**, p.2715-2726.

HARTIGAN, P. 1997. Human brucellosis:epidemiology and clinical manifestations. **Irish Vet. J., v.50**, n.3, p.179-180.

HAUSER, S.L. 1995. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. **Annals of Neurology, Boston**, v.38, p.702-704.

ITO S, ANSARI P, SAKATSUME M, DICKENSHEETS H, VAZQUEZ N, DONNELLY RP, LARNER AC, FINBLOOM DS, 1999. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. **Blood**. Mar 1;93(5):1456-63.

IBGE. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> 2008.

JACOBS, M., BROW N, ALLIE, N., GULERT, R., RYFFEL, B., 2000. Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. **Immunology** 100, 494-501.

JAHANS, K. L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E. S. 1997. The characterization of Brucella strains isolated from marine mammals. **Vet. Microbiol.**, v.57, n.4, p.373-382.

JIMENEZ DE BAGUES MP, DUDAL S, DORNAND J, GROSS 2005. A. Cellular bioterrorism: how Brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. **Clin Immunol**. Mar;114(3):227-38.

KAWAI, T S. AKIRA, 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, **Trends Mol Med**. 13, 460e469.

KUDI A. C. et al 1997. Brucellosis in camels. **Journal of arid environments.**, v.37, p.413-417.

LAPAQUE, N., MORIYON, I. , MORENO, E., et al. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.8.,p. 60-66.

LEÓN, F. C. 1994. Brucellosis ovina y caprina. Paris: **Office International des Epizooties**, 451p.

LI-YUN HUANG^{*}, CAETANO REIS E SOUSA[†], YASUSHI ITOH[‡], JOHN INMAN[§] AND DOROTHY E. SCOTT, 2001. IL-12 Induction by a Th1-Inducing Adjuvant In Vivo: Dendritic Cell Subsets and Regulation by IL-10. **The Journal of Immunology**. 167: 1423-1430.

LÓPEZ-GOÑI, C. , GUZMÁN-VERRI, L., MANTEROLA, A., et al. 2002. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrB/BvrS. **Vet. Microbiol.**, v.90, P.329-339.

MARGARET WANG, NILOFER QURESHI, NANCY SOEURT AND GARY SPLITTER, 2001. High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. **Microbial Pathogenesis**. v 31, Issue 5, November, Pages 221-230.

McGUIRK., P.; CANN, C.; MILK, K.H. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. **Journal of Experimental Medicine, New York**, v.195, n.2, p.221-231.

MEDZHITOV, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response, **Nature** 449, 819e826

METCALF, D. 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. **Nature, London**, v.339, n.6219, p. 27-30.

MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science, Washington**, v.248, p.1230-1234.

NICOLETTI, P. 1980. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine** 24, 69-95.

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

OLIVEIRA, S.C. and SPLITTER, G.A., 1998. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Researches**, 31, p 77-84.

OLIVEIRA, S.C., HARMS, J.S., BANAI, M and SPLITTER, G.A., 1996. Recombinant *Brucella abortus* protein that induce proliferation and Gamma-interferon secretion by CD4⁺ cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized Guinea pigs. **Cell Immunology**. 172, p262-268.

OLIVEIRA, S. C., OLIVEIRA, F. S., MACEDO, G. C., 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 and Infection**, p.1005-1009.

OSCAR BRUÑA-ROMERO AND ANA RODRIGUEZ, 2001. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. **Infect Immun**. August; 69(8): 5173–5176.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V.S. P. and LAGE, A. P. 2002. **Brucellosis in Brasil. Veterinary microbiology**. 90, p 55-62.

ROBERTSON, S.A.; SEAMARK, R.F.; GUILBERT, L.J.; WEGMANN, T. G 1994. The role of cytokines in gestation. **Critical Reviews in Immunology, New York**, v.14, p.239-292.

ROSINHA, G. M. S., FREITAS, D. A. MIYOSHI, A., et al 2002. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. **Infect. Immun**, v.70, p. 5036-5044.

Saraiva M, O'Garra, 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**. Mar;10(3):170-81.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E.; WHATMORE, A. M.; QUANCE, C. R.; et al. 2009. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates-first report. **J. Med. Primatology**., v.38, p.70-73.

SCHOLZ, H. C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; et al. 2009. *Brucella inopinata* sp. Nov., isolated from a breast implant infection. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 60: 801-808..

SOHN, A. H.; PROBERT, W. S.; GLASER, C. A.; et al. 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. **Emerging Infect. Diseases**., v.9, n.4, p.485-488.

SOO, C.; SHAW, W.W.; FREYMILLER, E.; LONGAKER, M.T.; BERTOLAMI, C.N.; CHIU, R.; TIEU, A .; TING, K. 1999. Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. **Journal of Cellular Biochemistry, New York**, v.74, p.1-10.

SHUAI, K.; SCHINDLER, C.; PREZIOSO, V.R.; DARNELL, J.E. Jr. 1992. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. **Science, Washington, v.258**, n.5089, p.1808-1812.

SPITTLER, A. ; SCHILLER, C.; WILHEIM, M.; TEMPFER, C.; WINKLER, S.; BOLTZ-NITULESCU, G. 1995. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. **Immunology, Oxford, v.85**, n.2, p.311-317.

TONE, M.; POWELL, M.J.; TONE, Y.; THOMPSON, S.A. ; WALDMANN, H. 2000. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. **Journal of Immunology, Bethesda, v.165**, p.286-291.

WALTER, M.R.; WINDSOR, W.T.; NAGABHUSHAN, T.L.; LUNDELL, D.J.; LUNN, C. A.; ZAUODNY, P.J.; NARULA, S.K. 1995. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high affinity receptor. **Nature, London, v.367**, p.230-235.

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**.

Y ZHAN, Z LIU, AND C CHEERS, 1996. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. **Infect Immun.** July; 64(7): 2782–2786.

YIFAN ZHAN AND CHRISTINA CHEERS, 1998. Control of IL-12 and IFN- γ Production in Response to Live or Dead Bacteria by TNF and Other Factors. **The Journal of Immunology**. 161: 1447-1453.

YAMAOKA K, OTSUKA T, NIIRO H, NAKASHIMA H, TANAKA Y, NAGANO S, OGAMI E, NIHO Y, HAMASAKI N, IZUHARA K., 1999. Selective DNA-binding activity of interleukin-10-stimulated STAT molecules in human monocytes J **Interferon Cytokine Res**. Jun;19(6):679-85.

YAMAMOTO, K.; QUELLE, F.W.; THIERFELDER, W.E.; KREIDER, B.L.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A ; COPELAND, N.G.; SILVENNOIENEN, O ; IHLE, J.N. 1994. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. **Molecular and Cellular Biology, Washington, v.14**, n.7, p.4342-4349.

ZHIONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J.E. JR. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science, Washington, v.264**, n.5155, p.95-98.