

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP

Juliana Melo

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS MOLÉCULAS PD-1, CD39 E
CD73 NA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA INFECÇÃO COM
A BACTÉRIA *Brucella abortus***

Juiz de Fora
2017

JULIANA MELO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS MOLÉCULAS PD-1, CD39 E
CD73 NA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA INFECÇÃO COM
A BACTÉRIA *Brucella abortus***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo

Juiz de Fora
2017

JULIANA MELO

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS MOLÉCULAS PD-1, CD39 E CD73 NA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA INFECÇÃO COM A BACTÉRIA *Brucella abortus*

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Exame de Qualificação aprovado em:

____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Priscila de Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora.

Dr^a Michele Cristine Ribeiro de Freitas
Universidade Federal de Juiz de Fora.

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo (orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora.

Dedico esse trabalho a Deus que em sua infinita bondade e amor me permitiu dar
mais esse passo em minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Seria impossível não iniciar os agradecimentos sem citar inicialmente Aquele que foi o grande pilar para a conclusão de mais uma etapa importante da vida. Meu muito obrigada a Deus por ter me amparado e sustentado até aqui. Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Regina e Ivamar por todo amor, orações, confiança e suporte. Obrigada por me amarem e entenderem a ausência.

Agradeço ao Professor Dr. Gilson Macedo pela orientação e suporte na realização desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de imunologia da UFJF que forneceram auxílio e fizeram esses últimos anos mais leves. Agradeço também a professora Dra. Priscilla Pinto e sua aluna Danielle Merconato pelo acolhimento no laboratório de Bioquímica da UFJF bem como pelo auxílio em experimentos.

Agradeço aos amigos de Resende por todo amor, apoio, torcida além da compreensão pela ausência.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry, 1943.

RESUMO

A brucelose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella* que acometem o homem e uma grande variedade de animais domésticos, resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção. Em humanos essa infecção pode causar febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas enquanto em animais leva ao aborto e infertilidade. Sabe-se que a resposta imunológica a bactérias intracelulares como a *Brucella* ocorre essencialmente através da imunidade mediada por células, sendo macrófagos especialmente importantes no combate à infecção. Entretanto, apesar da efetividade da resposta, a *B. abortus* conta com diversos mecanismos de evasão, o que garante a sua sobrevivência no organismo hospedeiro. Dentre estes mecanismos, a modulação de células apresentadoras de antígenos tem sido apontada como um dos mais relevantes. Recentemente, diversos trabalhos têm evidenciado a importância das NTPDases e da molécula PD-1 na modulação da resposta imune. As NTPDases estão envolvidas com a produção de adenosina que apresenta relevante caráter imunomodulador. Já a molécula PD-1 está associada a indução de um perfil anti-inflamatório com diminuição de IL-12 e aumento de IL-10. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar se a infecção com *B. abortus* é capaz de alterar a expressão destas moléculas e assim limitar a ação do sistema imune, favorecendo a sobrevivência do patógeno. Para isso, células RAW 264.7 foram infectadas com *B. abortus* e a modulação das moléculas CD80, CD86, CD40, MHCII, foi avaliada por citometria de fluxo. Em seguida, a expressão de CD39 também foi determinada por citometria de fluxo e por Western Blot. Por fim analisamos possíveis alterações na expressão da molécula PD-1 induzidas pela bactéria. Como resultados, foi confirmado que a infecção é capaz de inibir a expressão de CD80, CD86 e CD40, embora o mesmo não tenha sido observado com o MHCII. Além disso, a expressão de CD40 se mostrou diminuída mesmo após o estímulo com LPS. De forma surpreendente, foi observada uma diminuição na expressão das moléculas CD39 e PD-1, o que pode ser explicado pela menor ativação celular induzida pela infecção. Assim, os dados obtidos até o momento demonstram que as moléculas CD39 e PD-1 não são utilizadas pela *Brucella* para

modular as APCs, mas são influenciados pela menor ativação celular induzida pelo patógeno.

Palavras chave: *Brucella.abortus*. Imunomodulação. PD-1. CD39. CD73

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella* that affect humans and a wide variety of domestic animals, resulting in significant economic losses to production systems. In humans the infection can cause undulant fever, endocarditis, arthritis, osteomyelitis and neurological complications while in animals leads to abortion and infertility. It is known that the immune response to intracellular bacteria such as *Brucella* occurs primarily by cell-mediated immunity, macrophage being especially important in fighting infection. However, despite the effectiveness of the response, *B. abortus* has several avoidance schemes, which ensures their survival in the host organism. Among these mechanisms, modulation of antigen-presenting cells has been identified as one of the most relevant. Recently, several studies have shown the importance NTPDase and PD-1 molecule to modulate the immune response. The NTPDase are envolvidas with the production of adenosine which presents immunomodulatory relevant character. Since PD-1 molecule is associated with induction of an anti-inflammatory profile with decreased IL-12 and IL-10 increase. In this context, the aim of this study was to determine whether infection with *B. abortus* is able to alter the expression of these molecules and thus limit the action of the immune system, favoring the survival of the pathogen. To this end, RAW 264.7 cells were infected with *B.abortus* and modulation of CD80 molecules, CD86, CD40, MHCII, was evaluated by flow cytometry. Then the CD39 expression was also determined by flow cytometry and Western blot. Finally, we analyze possible changes in PD-1 molecule expression induced by bacteria. As a result, it was confirmed that the infection is capable of inhibiting expression of CD80, CD86 and CD40, although this has not been observed with MHCII. Additionally, CD40 expression showed decreased even after the stimulation with LPS. Surprisingly, it was observed a decrease in the expression of CD39 and PD-1

molecules, which can be explained by the lower cellular activation induced by the infection. Thus, the data obtained so far show that the PD-1 and CD39 molecules are not used by Brucella Modular APCs but are less influenced by cellular activation induced by the pathogen.

Keywords: *Brucella.abortus*. Immunomodulation. PD-1. CD39. CD73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores de superfície envolvidos no desenvolvimento de respostas imunológicas	24
Figura 2. Exemplificação da produção de adenosina após degradação sequencial de ATP/ ADP via CD39 e CD73 em macrófagos.....	28
Figura 3. Determinação da zona de macrófagos	35
Figura 4. Análise da expressão de moléculas coestimulatórias CD80	38
Figura 5. Análise da expressão de moléculas coestimulatórias CD86	39
Figura 6. Análise da expressão de moléculas MHC II.....	41
Figura 7. Avaliação da expressão de moléculas CD40	43
Figura 8. Análise da expressão de moléculas CD39	45
Figura 9 Identificação da NTPDase 1/ CD39 em macrófagos pela técnica de Western blotting	47
Figura 10. Avaliação da expressão de moléculas PD-1	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria.....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APC	“ <i>Antigen presented cell</i> ” - Células apresentadora de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
BB	Meio <i>Brucella Broth</i>
CTLA-4	“Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4” – Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	“Desoxyribonucleic acid
FoxP3	Fator de transcrição Forkhead Box P3
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3dioxygenase
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LPS	lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCP-1	“Monocyte chemoattractant protein-1” - Proteína quimiotática de monócitos-1
MHC	“Major Histocompatibility Complex” – Complexo de histocompatibilidade principal
MOI	“Multiplicity of infection” – Multiplicidade de infecção
NK	Natural Killer
NO	“Nitric Oxide” – Oxido nítrico
PAMPs	“Pathogen associated molecular patterns” - Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	“Phosphate buffered saline” - Tampão salina fosfato
PD-1	Programador de morte celular-1
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PRRs	“Pattern recognition receptor” - Receptores de reconhecimento de padrões
SFB	Soro fetal bovino

TCR	“ <i>T cell receptor</i> ” – Receptor de célula T
TGF- β	“Transforming growth factor beta” – Fator-beta de transformação do crescimento
T _H 1	“ T helper 1” – Linfócitos T auxiliar 1
T _H 2	“ T helper 2” – Linfócitos T auxiliar 2
TLR	“Toll Like Receptor” - Receptores do tipo Toll
TNF- α	“Tumor necrosis fator alpha” - Fator alfa de Necrose Tumoral
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.2. CARACTERÍSTICAS PATOGÊNICAS.....	16
1.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA <i>Brucella sp.</i>	19
1.4. REGULAÇÃO E IMUNOMODULAÇÃO.....	22
1.5. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....	25
1.5.1. AS NTPDases.....	26
1.6. <i>Brucella sp.</i> E EVASÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. LINHAGEM BACTERIANA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	32
3.2. LINHAGEM CELULAR.....	32
3.3. CULTURA DE CÉLULAS.....	32
3.4. CITOMETRIA DE FLUXO.....	33
3.5. CULTURA DE MACRÓFAGOS E PREPARO DE HOMOGENEIZADO CELULAR.....	35
3.5.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E IDENTIFICAÇÃO PELA TÉCNICA WESTERN BLOTTING.....	36
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4. RESULTADOS	37
5. CONCLUSÃO	51
6. PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella*, que acometem o homem e uma grande variedade de animais domésticos (NICOLETTI, 1989). Apresenta-se na forma endêmica em muitos países, resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção, além de sérias implicações na saúde animal e pública, visto seu caráter zoonótico (BRASIL, 2006).

1.1. HISTÓRICO

O grupo bacteriano responsável pela transmissão da brucelose foi descrito no homem pela primeira vez por Marston, em 1859, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada também de Febre de Malta (NICOLETTI, 2002; POESTER *et al.*, 2009).

Em 1887, o médico inglês, Sir David Bruce, isolou pela primeira vez uma bactéria do baço de soldados britânicos mortos na Ilha de Malta, denominando-a como *Micrococcus melitensis* (VIEIRA, 2004; GODFROID *et al.*, 2005; POESTER *et al.*, 2009). Já em 1895, Bernhard Bang, um patologista veterinário dinamarquês, isolou um microrganismo do útero e de membranas fetais resultantes do aborto de vacas, identificando-o como *Bacillus abortus* (NICOLETTI, 2002; POESTER *et al.*, 2009).

Nos EUA, em 1918, Alice Evans demonstrou que os microrganismos isolados por Bruce e Bang apresentavam similaridades morfológicas, imunológicas e de cultivo. Em 1920, baseados em tais evidências, Meyer e Shaw propuseram a criação do gênero *Brucella* em homenagem ao autor do primeiro isolamento do agente, além da designação dos dois microrganismos descobertos anteriormente por *Brucella melitensis* e *Brucella abortus*, respectivamente (CORRÊA e CORRÊA, 1992; VIEIRA, 2004; RIBEIRO, MOTTA e ALMEIDA, 2008).

No Brasil, o primeiro caso de brucelose humana foi descrito em 1913 por Gonçalves Carneiro e Danton Seixas, que um ano depois realizou pela primeira vez

no país o diagnóstico clínico da brucelose bovina no estado do Rio Grande do Sul (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; VIEIRA, 2004).

Atualmente, dentro do gênero *Brucella*, são descritas dez espécies independentes que são classificadas principalmente por diferenças de patogenicidade, preferência de hospedeiro e características bioquímicas e antigênicas (ALTON *et al.*, 1988; PAJUABA, 2006; OIE, 2009). As espécies conhecidas são classificadas da seguinte forma: *B. melitensis* (caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (cães), *B. ovis* (ovinos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. cetáceos* (cetáceos), *B. pinnipedia* (pinípedes), *B. microti* (ratazanas), e *B. inopinata* (desconhecido). Dentre essas espécies conhecidas de *Brucella*, apenas *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. canis* são patogênicas para os seres humanos, sendo que as infecções causadas por *B. canis* são raras nos mesmos (CLOECKAERT *et al.*, 2003; HE, 2012). Embora a *B. melitensis* seja a espécie mais patogênica, a *B. abortus* ganha destaque por ser a principal fonte de infecção em função da sua maior disseminação no mundo (CORBEL, 1997).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

A brucelose é uma zoonose distribuída mundialmente, sendo endêmica em regiões como América Latina, Oriente Médio, África, Ásia e na bacia do Mediterrâneo. Estima-se que são registrados anualmente no mundo cerca de meio milhão de novos casos de brucelose humana (MANTUR e AMARNATH, 2008; HE, 2012; AVILA-CALDERON *et al.*, 2013). Embora já tenha sido erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, além da Austrália, Japão e Nova Zelândia, essa zoonose reemergente continua se mostrando como um grave problema sanitário e econômico (CORBEL, 1997; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; OIE, 2009), podendo apresentar em determinados países uma taxa de prevalência superior a dez casos a cada cem mil habitantes, sendo ainda mais frequente em pessoas que trabalham em fazendas (MANTUR e AMARNATH, 2008).

O Brasil está localizado na área em que a brucelose é endêmica, porém sua disseminação no território é relativamente diferenciada, principalmente em virtude da ampla extensão territorial e as características próprias de cada região (POESTER *et al.*, 2002; RIBEIRO, MOTA e ALMEIDA, 2008; LAGE *et al.*, 2008).

Segundo boletim epidemiológico, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, em 2001, instituiu o Programa Nacional de Controle e

Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que consiste em um conjunto de medidas sanitárias estratégicas em busca da redução da prevalência e incidência da brucelose, adotando como medida profilática a vacinação de bezerras com idade entre três e oito meses em todo o país. Dentre outras atividades previstas no programa, destacam-se a adesão voluntária dos criadores na busca de rebanhos livres e monitorados, a prática de testes sorológicos regulares em rebanhos de elite para a participação em feiras e exposições, e o sacrifício dos animais positivos para brucelose (BRASIL, 2006).

Esse programa tem como intuito reduzir os impactos causados por essas doenças na saúde pública, além de promover a competitividade da pecuária nacional, haja visto que o Brasil detém o maior rebanho bovino comercial do mundo (IDAF, 2011).

Visando obter informações acerca da prevalência da brucelose bovina no Brasil, foi realizado nos estados brasileiros um levantamento epidemiológico a partir de dados amostrais obtidos de propriedades rurais entre os anos de 2001 e 2004. Tal estudo aponta que a prevalência de focos da doença nessas propriedades amostradas foi de 0,32% em Santa Catarina, 2,5% no Distrito Federal, 4,02% no Paraná, 4,2% na Bahia, 6,04% em Minas Gerais, 9% no Espírito Santo, 9,70% em São Paulo, 12,60% em Sergipe, 15,42% no Rio de Janeiro, 17,54% em Goiás, 21,22% em Tocantins e 35,18% em Rondônia (ALVES e VILLAR, 2011).

O controle dos patógenos associados à doença, aliado a medidas profiláticas como a vacinação dos reservatórios animais, são fatores que contribuem de forma satisfatória para a redução da incidência da brucelose humana, fato que vem sendo observado em alguns países como Austrália, países do norte Europeu e América do Norte (PAPPAS *et al.*, 2006^a).

1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA BACTÉRIA *Brucella sp.*

As bactérias do gênero *Brucella sp.*, patógenos causadores da brucelose, são classificadas como cocobacilos Gram-negativos pertencentes à classe Proteobacteria. São microrganismos intracelulares facultativos, imóveis e não esporulados, e apresentam-se na forma de bastonetes curtos que medem de 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm de dimensão (VELASCO *et al.*, 2000; REDKAR *et al.*, 2001; PROBERT *et al.*, 2004). Com relação a obtenção de energia, são classificados como

microrganismos aeróbios, entretanto, sob atmosfera com tensão de 5 - 10% de CO₂ há favorecimento para o isolamento de algumas espécies. Apresentam temperatura de multiplicação de 20 a 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal, e um pH ótimo que varia de 6.6 a 7.4 (PAJUABA, 2006; OIE, 2009).

Classicamente, as bactérias do gênero *Brucella* podem ser divididas em grupos antigenicamente distintos, sendo denominadas lisas ou rugosas. Tais grupos são embasados em características observadas durante o crescimento bacteriano em meios de cultura e na constituição química da parede celular - presença ou ausência da cadeia O - um dos componentes do lipopolissacarídeo (LPS) localizado na superfície externa da *Brucella* spp que possui relação com a virulência de algumas espécies (NIELSEN et al. 2004; CARDOSO *et al.*, 2006).

1.4. CARACTERÍSTICAS PATOGÊNICAS DA BACTÉRIA *Brucella* sp. E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ZONOSE

A patogenicidade das bactérias do gênero *Brucella* está intimamente relacionada a suas características morfológicas, aliadas aos mecanismos de evasão do microrganismo que favorecem a penetração, sobrevivência e multiplicação no hospedeiro (ARÉSTEGUI *et al.*, 2001; NIELSEN *et al.*, 2004; XAVIER, 2009).

Em humanos, a brucelose pode ser veiculada pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente leite e derivados que não passaram por processamento térmico. Essa doença é transmitida também através do contato direto ou indireto com animais infectados, fetos abortados ou anexos fetais, além da manipulação de carcaças e vísceras provenientes de animais infectados, sem a utilização de equipamentos de segurança (PAULIN e FERREIRA, 2008). Em regiões endêmicas, a via de infecção mais comum é o consumo de produtos lácteos não pasteurizados, principalmente o leite e o queijo (JONG; ROLAN e TSOLIS, 2010; EKICI *et al.*, 2012; AVILA-CALDERON *et al.*, 2013).

Uma vez no interior do hospedeiro, seja em humanos ou outros animais, as bactérias do gênero *Brucella* podem persistir nas células do sistema monocítico fagocitário, nas secreções uterinas, na glândula mamária e na medula óssea. Sendo assim, o descarte adequado dos tecidos que concentram um grande número de bactérias pode reduzir e evitar a contaminação de carcaças e vísceras durante o abate (CARVALHO *et al.*, 1995; PESSEGUEIRO, BARATA e CORREIA, 2003; PARDI *et al.*, 2006).

A capacidade de penetração pela pele lesada ou íntegra e pelas membranas mucosas favorece a classificação dessa zoonose como uma enfermidade de caráter ocupacional, visto que acomete profissionais que desenvolvem atividades com maior risco de exposição ao agente causador da doença, sendo estes, conseqüentemente, mais propícios à infecção conforme tem sido observado em veterinários, laboratoristas e trabalhadores de matadouros e frigoríficos (LAGE *et al.*, 2008; MINHARRO, 2009; OIE, 2009). Corroborando esses dados, estudos apontam a brucelose como a doença bacteriana mais comumente adquirida em laboratório no mundo (LUNAMARTÍNEZ e MEJÍA-TERÁN, 2002; PAPPAS *et al.*, 2006^a).

As bactérias do gênero *Brucella sp* podem apresentar dose infecciosa até mesmo em baixas quantidades, além de possuírem grande potencial de dispersão pelo ar facilitando assim sua transmissão, visto que são bactérias facilmente aerossolizadas. Sabe-se também que infecções humanas com estas bactérias são debilitantes e difíceis de tratar (FRANZ *et al.*, 1997; PAPPAS e PAPADIMITRIOU, 2007). Em função dessas características, estas bactérias encontram-se na lista dos agentes etiológicos que requerem atenção com relação ao seu potencial uso em bioterrorismo (GREENFIELD *et al.*, 2002; PAPPAS *et al.*, 2006^b).

Em diversos grupos animais, a brucelose apresenta-se como uma infecção crônica que persiste por toda a vida. O tropismo da bactéria pelos órgãos reprodutores é responsável por suas principais manifestações que são o aborto, a infertilidade e falhas reprodutivas (PESSEGUEIRO; BARATA e CORREIA, 2003; FRANCO *et al.*, 2007).

Com relação aos seres humanos, essa infecção pode causar sintomas como febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite além de complicações neurológicas. Tem sido relatado que formas agudas e crônicas da brucelose podem afetar também a coluna vertebral (PAPPAS *et al.*, 2005) causando uma derivação da doença conhecida como brucelose espinhal que afeta principalmente idosos. A brucelose também pode levar à inflamação das articulações causando artrite, geralmente registrada nos pacientes com até 30 anos (ALP e DOGANAY, 2008).

A doença raramente é fatal em seres humanos, apresentando um percentual de cerca de 2% de óbito, entretanto essa infecção pode provocar debilidade severa e levar à incapacidade do hospedeiro. A doença tende à cronicidade e persistência, podendo se tornar uma doença granulomatosa capaz de afetar qualquer órgão (CHRISTOPHER; UMAPATHY e RAVIKUMAR, 2010).

Diagnosticar a brucelose humana de forma rápida e precisa ainda é considerado um desafio para profissionais da saúde em virtude de suas

características clínicas não específicas, sendo frequentemente confundida com a gripe em função da similaridade entre os sintomas iniciais (MEMISH *et al.*, 2000).

Dentre os métodos para diagnóstico, o isolamento do microrganismo, também conhecido como teste direto, é o teste padrão para confirmar a infecção, porém esse método requer tempo e técnicos qualificados. Além disso, o manuseio das amostras contendo o patógeno representa um alto risco de contaminação (LUNAMARTÍNEZ e MEJÍA-TERÁN, 2002; PAPPAS *et al.*, 2006^a). Já os testes indiretos ou sorológicos detectam os anticorpos contra *Brucella spp* presentes em diversos fluidos corporais como sangue, muco vaginal, sêmen e leite (POESTER *et al.*, 2009).

Até o momento, a ausência de uma vacina eficaz para a prevenção desta zoonose em seres humanos faz com que a erradicação ou controle da doença sejam feitos a partir de medidas aplicadas ao animal hospedeiro. O tratamento dessa infecção é alvo de discussão visto que ainda não existe acordo em relação ao melhor protocolo a ser usado, mas este geralmente requer a utilização prolongada de uma combinação de antibióticos, que produz um alívio na sintomatologia, diminuindo a duração da doença e a ocorrência de complicações, podendo assim prevenir uma possível recaída (PESSEGUEIRO; BARATA e CORREIA, 2003; ARIZA *et al.*, 2007; FANNI *et al.*, 2013).

Além de apresentar relevância clínica quando acomete o homem, a ocorrência da brucelose em outros animais pode resultar em perdas econômicas significativas como a imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional de produtos de origem animal levando a perdas no rendimento industrial, gastos significativos devido aos altos custos para a implementação dos programas de controle e erradicação da doença, além de prejuízos envolvendo a produção animal, devido ao elevado número de abortos, nascimento de animais fracos, baixa fertilidade nas propriedades rurais e, principalmente, o declínio na produção de leite e carne (POESTER *et al.*, 2009).

1.5. RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA *Brucella sp.*

A resposta imune efetiva contra a *Brucella sp* se inicia com o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs - do inglês, pathogen associated molecular patterns) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - do inglês, Pattern recognition receptor) (KAWAI e AKIRA, 2007) presentes na membrana plasmática ou em compartimentos intracelulares que permitem ao

hospedeiro distinguir bactérias de agentes virais e parasitários (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; HOEBE, JANSSEN e BEUTLER, 2004). Entre os PRRs, os receptores do tipo Toll (TLR – do termo em inglês Toll Like Receptor) recebem destaque uma vez que, após o reconhecimento e ligação aos PAMPs, atuam de forma direta ou indireta no processo de geração de respostas imunológicas inatas e adaptativas contra organismos invasores através de sinalizações distintas, exercendo também importante papel na ativação de linfócitos (O'NEILL, 2006). Além de atuarem na detecção e reconhecimento de patógenos, os TLRs ativam cascatas de sinalização induzindo a expressão de moléculas coestimulatórias como CD80 e CD86 expressas sobre a superfície das células apresentadora de antígenos (APC, do inglês, *antigen presented cell*) - células dendríticas, macrófagos e células B - favorecendo assim o estabelecimento de respostas imunológicas (HOLGATE, 2012; DEURLOO *et al.* 2003).

Em relação aos receptores TLRs envolvidos no reconhecimento da *Brucella sp*, estudos anteriores sugerem que os receptores TLR2 e TLR4 reconhecem esse patógeno e participam da sinalização que conseqüentemente induz a produção de diferentes citocinas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em 2005, Huang e colaboradores demonstraram que o DNA (DNA – do termo em inglês desoxyribonucleic acid) da *Brucella sp* apresenta ligantes para o receptor TLR9 e que a resposta de citocinas do tipo T_H1 (T helper 1) é dependente dessa ativação (HUANG *et al.*, 2005).

Colaborando com esses dados, em 2008, Macedo e colaboradores evidenciaram a importante participação do TLR9 nesta resposta uma vez que sua ausência acarretou significativo aumento da carga bacteriana esplênica, associado a uma redução na produção da citocina IL-12 em macrófagos e em células dendríticas. Apesar disso, a produção da citocina TNF- α (Fator alfa de Necrose Tumoral) e de NO (NO - do inglês nitric oxide) não foi afetada pela ausência de TLR9, sugerindo a existência de outros receptores envolvidos nesta resposta. (HUANG *et al.*, 2005; MACEDO *et al.*, 2008). Além disso, em estudos mais recentes (2013), Almeida e colaboradores demonstraram que o TLR6 também é um importante componente envolvido no combate ao patógeno e está associado a produção de IL-12 e TNF- α por macrófagos e células dendríticas. (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Após serem reconhecidas por tais receptores, bactérias intracelulares como a *Brucella sp* serão combatidas principalmente através de mecanismos mediados por células que são atraídas para o sítio infeccioso por meio de quimiocinas como a IL-8

e MCP-1, bem como a produção de citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o TNF- α (COELHO-CASTELLO *et al.*, 2009).

Dentre os diversos tipos celulares envolvidos, os macrófagos são especialmente importantes na infecção pela *Brucella abortus* uma vez que são os principais locais de sobrevivência e replicação da bactéria (BALDWIN e GOENKA, 2006). A ativação de macrófagos leva a fagocitose e a destruição do microrganismo através da produção de uma variedade de mediadores bioquímicos que atuam diretamente contra as bactérias, dentre eles o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻) e o óxido nítrico (NO) são os mais eficazes (COELHO-CASTELLO *et al.*, 2009). Além disso, a ativação de macrófagos e de células dendríticas estimula a produção da citocina IL-12 que, como já mencionado, possui um papel de extrema relevância. Esta citocina é a grande responsável pela diferenciação dos linfócitos T para o perfil TH1, relacionado a liberação de citocinas de caráter pró-inflamatório como IFN- γ e o TNF- α que ativam mais macrófagos e potencializam a destruição do patógeno (BIRON, 1999; HUANG *et al.*, 2001). Adicionalmente, a IL-12 também ativa células *Natural Killer* (NK) que respondem produzindo mais IFN- γ potencializando a ativação de macrófagos (MURPHY *et al.*, 2001).

Tendo em vista que a atuação exclusiva da resposta imunológica inata não é capaz de promover a eliminação de bactérias patogênicas, há necessidade da participação da resposta imunológica adaptativa. Nesta etapa destacam-se os mecanismos efetores que envolvem linfócitos TCD4 e TCD8 (COELHO-CASTELLO *et al.*, 2009).

A ativação dos linfócitos T CD4 ocorre mediante dois sinais. O primeiro estímulo é recebido por esta célula a partir de um receptor presente em sua superfície, chamado TCR (do inglês, *T cell receptor*) que se liga especificamente a um peptídeo antigênico que é apresentado via MHC II (MHC - do inglês, Major Histocompatibility Complex), presente na superfície de uma célula apresentadora de antígenos (APC - do inglês, *antigen presented cell*). O segundo sinal essencial para a ativação linfocitária é fornecido por moléculas coestimulatórias que são expressas na superfície de células apresentadoras de antígeno ativadas. Classicamente, as moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) recebem destaque entre as moléculas coestimulatórias e exercem papel fundamental na ativação de linfócitos T a partir da interação com o correceptor CD28 que é constitutivamente expresso na superfície de células T (POD OJIL e MILLER, 2013).

Sabe-se também que a interação entre as moléculas coestimulatórias CD40L-CD40 possui papel fundamental em processos imunes celulares. Tem sido

demonstrado que a ligação entre a molécula CD40L, expressa principalmente pelas células T e B ativadas, a molécula CD40, presente na superfície das APCs, impulsiona a produção de citocinas e induz a expressão de moléculas coestimulatórias facilitando assim a apresentação antigênica (ELGUETA *et al.*, 2013).

Outro tipo celular importante na resposta imune contra *B. abortus* são os linfócitos T CD8. Uma vez ativadas, estas células se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs) capazes de reconhecer e eliminar células alvo através da liberação de proteínas citotóxicas e secreção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ e TNF- α , que ativam os fagócitos (MURPHY *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que camundongos que não são capazes de montar uma resposta através de linfócitos T CD8⁺ (deficientes em MHC de classe I) apresentam um quadro de brucelose exacerbado, com um aumento substancial na carga bacteriana esplênica (OLIVEIRA e SPLITTER, 1995).

Os linfócitos B também desempenham importante papel no combate ao patógeno uma vez que atuam na produção de anticorpos antígeno-específico capazes de neutralizar e opsonizar o microrganismo, além de ativar o sistema do complemento e promover a citotoxicidade mediada por células (ADCC) (SKENDROS e BOURA, 2013).

Em resumo, uma resposta imune efetiva contra a *Brucella* depende basicamente da ativação de linfócitos T via MHCI e MHCII, com auxílio dos coestimuladores (CD80 e CD86). Estas células ativadas se diferenciam em linfócitos T_H1 ou CTLs que vão, respectivamente, potencializar a atividade dos macrófagos e destruir células infectadas.

1.6. REGULAÇÃO E IMUNOMODULAÇÃO

Em paralelo a ativação imunológica dita anteriormente, um organismo saudável frente a infecções apresenta também a atuação simultânea de uma resposta regulatória que é extremamente importante para a manutenção da homeostase (HOLGATE, 2012). Tal resposta compõe o repertório imunológico e é obtida através de células e moléculas que possuem a função de suprimir a atuação do sistema imunológico e, conseqüentemente, manter a autotolerância e prevenir potenciais efeitos patogênicos (YAN e LIU, 2009; FEUERER *et al*, 2009).

Tem sido relatado que, independente da linhagem, todas as células com caráter regulatório identificadas até o momento podem exercer sua função supressora através de características atribuídas a dois mecanismos essenciais, sendo eles o contato direto ou a secreção de citocinas imunossupressoras (SKAGGS, SINGH e HAHN, 2008).

Dentre as principais citocinas relevantes para o perfil regulatório estão o TGF- β , IL-10 e a IL-35 que, em geral, promovem a anergia de células T e/ou disfunção de células apresentadoras de antígenos (BELKAID, 2007).

O TGF- β apresenta efeitos antiproliferativos uma vez que é capaz de inibir a produção da citocina IL-2, essencial para a proliferação de células T (BRABLETZ *et al.*, 1993). Além disso, essa citocina é capaz de induzir a diferenciação de células dendríticas para um perfil tolerogênico, limitando a expressão de CD40, CD86 e de MHCII, além de aumentar a expressão de CD45RB que é considerado um importante marcador de células dendríticas tolerogênicas. A citocina em questão também apresentou potencial indutor deIDO (Indoleamine-pyrrole 2,3dioxygenase) que é responsável pela degradação de triptofano (Song *et al*, 2014). Sabe-se que a falta desse aminoácido essencial tem sido apresentada como causa da inibição da ativação de células T e, conseqüentemente, responsável pela indução de apoptose dessas células (FALLARINO *et al.*, 2003).

A citocina IL-10 também é uma importante molécula imunorregulatória, sendo produzida principalmente por linfócitos T, células B, macrófagos, neutrófilos e também por alguns subconjuntos de células dendríticas (SARAIVA; O'GARRA, 2010). Essa citocina apresenta proeminente atividade anti-inflamatória tendo sua atuação primária em fagócitos e em células apresentadoras de antígeno, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-12, a expressão de

moléculas de MHC II e coestimulatórias, bem como a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MOORE *et al.*, 2001).

Outra linha de atuação de células regulatórias é o contato célula- célula. Nesse contexto a elevada expressão de moléculas coinibitórias como o CTLA-4 e PD-1, também tem participação relevante para o perfil regulatório (BELKAID, 2007) (Figura1).

A molécula CTLA-4 (do inglês, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) leva a inibição da ativação de células T por indução de um sinal negativo que coincide com a estimulação do TCR e/ou por coestimulação inibitória competitiva devido à alta afinidade em ligar-se ao CD80 e/ou CD86 quando comparado com CD28. A ligação entre células T e APCs via CTLA-4 – B7 acarreta na inibição das APCs e, conseqüentemente, na supressão das respostas de células T (VIGNALI, COLLISON e WORKMAN, 2008).

Outra proteína que merece destaque na via de inibição é a molécula CD279 também conhecida como PD-1 (Programadora de morte celular-1) e seus ligantes PDL-1 e PDL-2, pertencentes à família B7:CD28. Tais moléculas são expressas em vários tecidos, com maiores níveis nos pulmões, coração e fígado, sendo que a expressão das mesmas é induzida por diferentes citocinas (BROWN *et al.*, 2003).

A molécula PD-1 é encontrada em células T CD4 e CD8, células B e células mieloides ativadas, entretanto, não é encontrado em células não estimuladas. Sua descrição foi concomitante a dos seus ligantes, PDL-1 e PDL-2, que são encontrados em monócitos e células dendríticas ativadas, sendo que a expressão de tais ligantes parece ser regulada pela citocina IFN- γ ou IFN- γ / LPS (LECHNER *et al.*, 2001).

A atuação do PD-1 na modulação da resposta imune é diferente da utilizada pela molécula CTLA-4, embora ambas tenham a capacidade de suprimir a ativação de células T (PARRY *et al.*, 2005). Sabe-se que após interação com seus ligantes ocorre recrutamento de fosfatases que atuam nas quinases responsáveis pela sinalização via TCR, acarretando a redução dessa via de sinalização e conseqüentemente, inibindo a proliferação e produção de citocinas por células T (GREENWALD, FREEMAN e SHARPE, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2008).

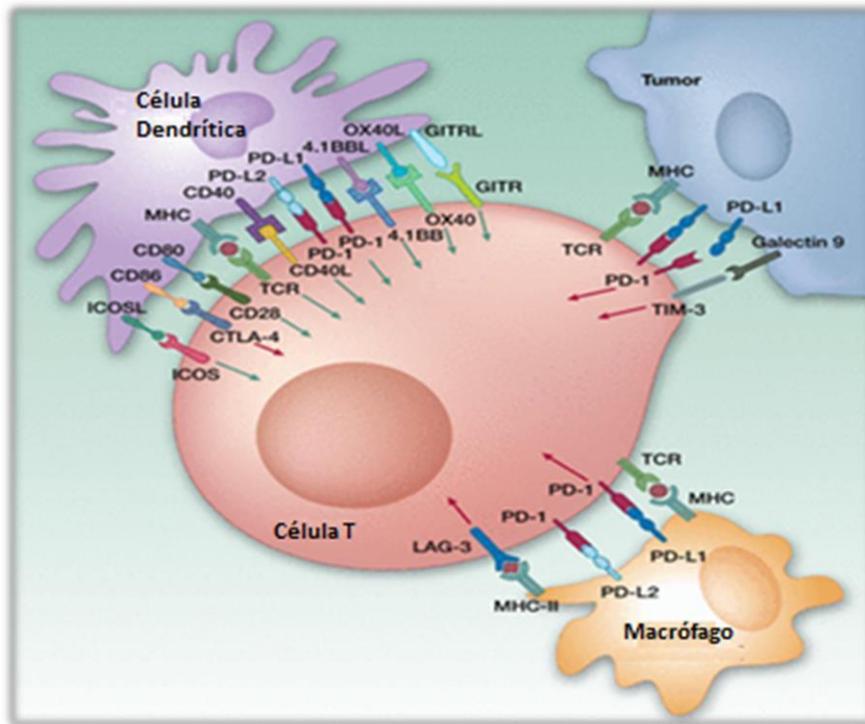


Figura 1: Marcadores de superfície envolvidos no desenvolvimento de respostas imunológicas. Expressão de moléculas coestimulatórias e coinibitórias na superfície de células dendríticas, macrófagos, e células tumorais capazes de gerar respostas variadas de acordo com o receptor alvo presente nas células T. FONTE: Adaptado de SHARMA, 2012; MELERO *et al.*, 2013.

Embora a função da molécula PD-1 já tenha sido bastante estudada na regulação de células T, o seu papel na imunidade inata ainda não está bem elucidado. O mecanismo de atuação dessa molécula foi estudado em macrófagos por Huang e colaboradores, que demonstraram que a expressão de PD-1 pode ser induzida em monócitos e macrófagos frente a resposta inflamatória e dano tecidual, além de apresentar sua expressão ampliada em respostas imunológicas contra bactérias. Foi visto também que animais PD-1 γ/γ sépticos apresentaram os níveis citocinas pró-inflamatórias elevados e reduzida capacidade de combater/reveter o quadro de septicemia (HUANG *et al.*, 2009)

Colaborando com esses dados, também em 2009, Guitierrez mostrou que frente a infecção com *Trypanosoma cruzi* ocorre aumento da expressão de PD-1 em macrófagos, e que a deficiência dessa proteína ocasiona o aumento da capacidade tripanocida dessas células devido a otimização da ativação celular por IFN- γ , acarretando o aumento da produção de NO (GUTIERREZ, 2009). Tais dados

sugerem que a atuação da molécula PD-1 em fagócitos é similar a que ocorre em células T, sendo então responsáveis pela regulação das respostas imunológicas.

1.5. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

O termo purinérgico foi introduzido em 1972 por Burnstock ao sugerir que moléculas de ATP atuam como um novo transmissor em células neuronais. Com o avanço das pesquisas, novos dados corroboraram o papel dos nucleotídeos como compostos de sinalização extracelular (KÖLES, FÜRST e ILLES, 2007; BURNSTOCK, 2012).

Os purinoreceptores são representados por diversas famílias e provavelmente são um dos receptores mais abundantes em mamíferos (ABBRACCHIO *et al.*, 2006). Sua sinalização é dependente de uma variedade de fatores, tais como a expressão do receptor, sua sensibilidade aos ligantes e a concentração de nucleotídeos extracelulares (BOURS *et al.*, 2006).

Os receptores purinérgicos são caracterizados como proteínas transmembranares agrupadas em duas grandes famílias, P1 e P2, de acordo com os efeitos farmacológicos de antagonistas e agonistas dos nucleosídeos e nucleotídeos (BOURS *et al.*, 2006).

Os receptores P1 pertencem a superfamília de receptores do tipo serpentina, sendo subdivididos em receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, que se ligam a adenosina extracelular com diferentes afinidades (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

Com relação a família dos receptores do tipo P2, sabe-se que é subdivida em duas sub-famílias, sendo elas P2X e P2Y (BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. 2004). Os receptores do tipo P2X são proteínas transmembranares em forma de canal iônico que respondem primariamente ao ATP extracelular e os receptores do tipo P2Y são proteínas transmembrana que apresentam responsividade específica de acordo com as subdivisões existentes nesse grupo (ABBRACCHIO *et al.*, 2006). Atualmente já foram descritos oito subtipos do receptor P2Y (P2YR_{1,2,4,6,11,12,13,14}), sendo eles responsivos a nucleotídeos purínicos (ATP, ADP) e pirimidínicos (UDP e UTP) (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; JACOBSON, JAYASEKARA e COSTANZI, 2012).

Considerando que o controle dos níveis de nucleotídeos bem como a ativação dos seus receptores específicos são fatores essenciais para manutenção dos processos fisiológicos dependentes da sinalização purinérgica, tais como inflamação

e tromborregulação (ROBSON, SEVIGNY e ZIMMERMANN, 2006), cabe salientar a importância das enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados em seus respectivos mononucleotídeos permitindo assim sua ligação a purinoreceptores e conseqüentemente, a sinalização dependente dessa via (ZIMMERMANN, 2001).

1.5.1. AS ECTO-NUCLEOTIDASES

Os principais nucleotídeos que exercem função biológica são o ATP, ADP e AMP. Essas moléculas são formadas a partir de uma base nitrogenada e uma pentose - ribose - constituindo os nucleosídeos, que posteriormente são fosforilados por quinases (ATKINSON *et al.*, 2006). Os nucleotídeos representam uma importante classe de compostos extracelulares que, ao interagirem com seus receptores específicos, são responsáveis pela ativação de vias de sinalização fundamentais para o funcionamento celular (SOSLAU e YOUNGPRAPAKORN, 1997).

Sabe-se que tanto nucleotídeos quanto nucleosídeos podem ser liberados no espaço extracelular durante lesão mecânica, necrose, apoptose, ativação de células inflamatórias (IDZKO, FERRARI e ELTZSCHIG, 2014) e/ou em resposta a patógenos exógenos (BOURS *et al.*, 2006).

Já foi relatado também que moléculas de ATP, além de participarem do processo de neurotransmissão, contração muscular, vasodilatação, metabolismo ósseo e metabolismo do glicogênio no fígado (BOURS *et al.*, 2006), também atuam como um importante sinalizador na inflamação juntamente com o produto da sua hidrólise, o ADP (SOUZA *et al.*, 2011).

Adicionalmente, o AMP, um metabólito intermediário da hidrólise do ATP, funciona como importante molécula sinalizadora intracelular, sendo também substrato para a formação de adenosina (figura 2) que participa da regulação do processo inflamatório e apresenta efeitos imunomodulatórios (SOUZA *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que o acúmulo de adenosina é capaz de reduzir a fagocitose e a produção de reativos de oxigênio por macrófagos e neutrófilos além de inibir a produção de IL-12 e TNF- α . Além disso, tem sido sugerido que esta molécula é capaz de transformar macrófagos classicamente ativados (M1), relacionados com processos inflamatórios, em macrófagos alternativamente ativados (M2) (HASKÓ e PACHER, 2012). Esses últimos estão associados a um perfil regulador, sendo grandes produtores de IL-10 e TGF- β (BELKAID, 2007)

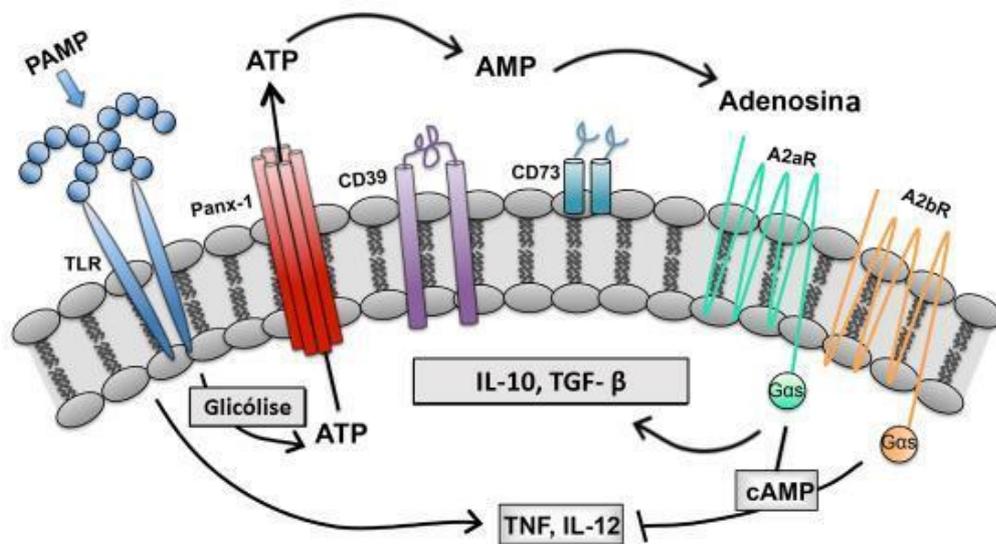


Figura 2: Exemplificação da produção de adenosina após degradação sequencial de ATP/ ADP via CD39 (ENTPD1; ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) e CD73 (ecto-5'-nucleotidase) em macrófagos. ATP intracelular, gerado em resposta a padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPS), é liberado e convertido a adenosina pela ação das moléculas CD39 e CD73. A ligação da adenosina a seus receptores é capaz de reduzir a produção de citocinas inflamatórias e estimular a produção de citocinas imunomoduladoras. FONTE: Adaptado de HAMIDZADEH e MOSSER, 2016.

Nesse contexto, as ecto-nucleotidases, enzimas que podem tanto ser secretadas quanto localizadas nas membranas celulares (IVANENKOV, MURPHY-PIEDMONTE e KIRLEY, 2003; MURPHY-PIEDMONTE, CRAWFORD e KIRLEY, 2005), tem sido foco de diversos estudos visto que possuem como função primária o metabolismo de nucleotídeos. Sabe-se que os produtos deste metabolismo estão

envolvidos em diversos processos celulares, incluindo a mediação da resposta imunológica (figura 2) e interação parasito-hospedeiro (DE MARCO *et al.*, 2003; MAIOLI *et al.*, 2004).

A presença destas enzimas foi demonstrada em animais vertebrados e invertebrados, plantas, leveduras (HANDA e GUIDOTTI, 1996; ZIMMERMANN E BRAUN, 1996; SMITH e KIRLEY, 1998) e diferentes protozoários como *Toxoplasma gondii* (BERMUDER *et al.*, 1994; SILVERMAN *et al.*, 1998), *Leishmania amazonensis* (BERREDO-PINHO *et al.*, 2001; COIMBRA *et al.*, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2006), *Entamoeba histolitica* (BARROS *et al.*, 2000), *Trichinella spiralis* (GOUNARIS, 2002), *Trichomona vaginalis* (DE AGUIAR MATOS *et al.*, 2001), e *Crithidia deanei* (DOS PASSOS LEMOS *et al.*, 2002). Em 2007, foi descrita também em procarionto, a *Legionella pneumophila*, um agente causal de pneumonia (SANSOM *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos apresentam também uma correlação entre a ativação de hidrólise de ATP e um dado efeito biológico na interação parasito-hospedeiro (SILVERMAN *et al.*, 1998; SANSOM *et al.*, 2007; DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA, E. *et al.*, 2008; SANSOM, ROBSON e HARTLAND, 2008; Santos *et al.*, 2009). Estes estudos, aliados a outros trabalhos, fazem associações entre fatores como a presença genética, a expressão gênica e/ou a atividade enzimática de ectonucleotidases de parasitos com a virulência, adesão celular, saída do parasito da célula infectada, controle da concentração de nucleotídeos das células hospedeiras e do meio extracelular e escape do sistema de defesa do hospedeiro (DE MARCO *et al.*, 2003; MAIOLI *et al.*, 2004).

Na literatura existem sinônimos para este grupo de enzimas, como ecto-ATPase e ecto-ATPDase. A fim de facilitar a comunicação no meio científico, em 2001, Zimmermann e colaboradores propuseram uma nomenclatura única para este grupo enzimático, NTPDases. Contudo, o termo CD39 usado para designar a NTPDase 1 ainda é utilizado na imunologia (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; ROBSON, SEVIGNY e ZIMMERMANN, 2006).

A NTPDase 1, ou CD39, foi caracterizada primeiramente como um marcador de ativação linfóide expresso em linfócitos B (MALISZEWSKI *et al.*, 1994). Posteriormente sua expressão foi observada também em células T ativadas, células *Natural Killer* (NK), monócitos, células dendríticas (KOZIAK *et al.*, 1999), células T Regulatórias (TReg) e macrófagos (DWYER *et al.*, 2007), desempenhando importante função na sinalização purinérgica e, conseqüentemente, na resposta

imune visto que essa enzima é responsável pela degradação de ATP em AMP (ANTONIOLI *et al.*, 2013). Sabe-se ainda que CD39 pode ter participação na adesão celular, proliferação, apoptose mediada por ATP e na secreção de citocinas (DWYER *et al.*, 2007).

Outra enzima que desempenha importante papel no metabolismo extracelular de nucleotídeos é a CD73 (ecto5'-nucleotidase). Essa molécula é considerada um antígeno de diferenciação leucocitário, além de ser caracterizada como um marcador de ativação de linfócitos T (CHRITENSEN, ANDERSEN e RYDER, 1996). Em relação a sinalização purinérgica, o CD73 é responsável pela conclusão da cascata de hidrólise do ATP, atuando na conversão de AMP em adenosina (ANTONIOLI *et al.*, 2013) que, como já citado, apresenta importantes efeitos imunomodulatórios.

A atuação enzimática das moléculas CD39 e CD73 no sistema imune tem sido alvo de diversos estudos uma vez que claramente exercem importante papel em sua função, bem como na regulação das respostas imunológicas.

1.6. *Brucella sp.* E EVASÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Com a finalidade de assegurar a sobrevivência e a progressão da infecção, sabe-se que diversos patógenos utilizam as mais variadas estratégias de escape para manipular os mecanismos regulatórios do sistema imune (BELKAID, 2007).

Como exemplo dessas estratégias, há mecanismos que envolvem a indução de respostas regulatórias normalmente associadas com o término das respostas imunes efetoras do hospedeiro. Essa indução pode ser feita diretamente, através da produção de citocinas regulatórias em resposta aos constituintes do patógeno, ou de forma indireta, através da geração de células com características regulatórias (BELKAID, 2007).

A manipulação de células apresentadoras de antígenos também pode ser caracterizada como um mecanismo de evasão visto que interfere na expressão de moléculas coestimulatórias, além de ser capaz de induzir a produção de citocinas que podem direcionar os linfócitos para um perfil regulatório (BELKAID, 2007).

Em relação a *Brucella*, sabe-se que dentre os mecanismos que impedem a detecção destas bactérias pelo sistema imunológico do hospedeiro estão a infecção intracelular prolongada com modificação da expressão dos genes, a sobrevivência

em vesículas acidificadas, a alteração da apoptose de macrófagos com bloqueio da fusão do fagolisossomo e redução da ativação dos mecanismos inflamatórios (RAJASHEKARA *et al.*, 2006).

Os microrganismos pertencentes a essa linhagem bacteriana são fagocitados principalmente por macrófagos logo após penetrarem na mucosa. Desse modo, sem ativarem fortemente o sistema imune tais bactérias coordenam a expressão de múltiplos fatores de virulência relacionados a sua entrada e tráfego, favorecendo assim a ocupação e permanência em seu nicho de replicação (RAMBOW-LARSEN *et al.*, 2009). Diversos mecanismos reguladores da expressão gênica foram identificados no gênero *Brucella*, entre eles o *Quorum sensing*, *stringent response*, sistema regulatório de dois componentes e, mais recentemente, o *blue-light responsive LOV-HK protein*, que é responsável pela adaptação da bactéria a diferentes ambientes (RAMBOW-LARSEN *et al.*, 2009).

Além dos mecanismos já descritos acima, tem sido sugerido que este patógeno é capaz de modular as células apresentadoras de antígenos de forma a favorecer sua sobrevivência. De fato, já foi demonstrado que esta bactéria é capaz de infectar macrófagos (BALDWIN e GOENKA, 2006), linfócitos B (GOENKA *et al.*; 2012) e células dendríticas (SALCEDO *et al.*, 2008), sendo também capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 (SATHIYASEELAN *et al.*, 2006). Além disso, APCs infectadas com *Brucella* apresentam uma redução na expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (ZAITSEVA *et al.*, 1996; BILLARD, DORNAND e GROSS, 2007; SALCEDO *et al.*, 2008), bem como uma influência negativa sobre a expressão da molécula apresentadora MHC II (HELLER *et al.*, 2012). A redução na expressão dessas moléculas resulta em uma menor ativação e proliferação de linfócitos, podendo favorecer a sobrevivência do patógeno. Entretanto, apesar de importantes, os mecanismos envolvidos nesta imunomodulação ainda não foram completamente elucidados.

Sendo assim, uma vez que diversos estudos têm evidenciado a influência da molécula PD-1 e das ecto-nucleotidases CD39 e CD73 na ativação e produção de citocinas por células apresentadoras de antígenos, aliado ao fato de não existirem estudos que relacionam estes marcadores à *Brucella*, o objetivo deste trabalho é determinar se a infecção com *B. abortus* é capaz de alterar a expressão destas moléculas e assim limitar a ação do sistema imune, favorecendo a sobrevivência do patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação das moléculas PD-1, CD39 e CD73 na imunomodulação induzida pela bactéria *Brucella abortus* em células da imunidade inata.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar a expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, bem como da molécula apresentadora MHC II em macrófagos, células dendríticas e linfócitos B frente a infecção com *B.abortus*.

2.2.2. Avaliar a expressão das moléculas CD39 e CD73 em macrófagos, células dendríticas e linfócitos B infectados por *B. abortus*.

2.2.3. Caracterizar os mecanismos de ação do efeito imunomodulador desempenhado pela bactéria *B.abortus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 8 e 10 semanas, pesando cerca de 18 a 20 g, que foram adquiridos do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e mantidos no Biotério do laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora com água e ração *ad libitum*.

3.2. LINHAGEM BACTERIANA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas nesse trabalho bactérias *B. abortus* pertencentes as linhagens S2308 e RB51, ambas disponíveis no Laboratório de Imunologia de doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As linhagens utilizadas nos ensaios foram cultivadas em meio *Brucella Broth* (BB) líquido (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). As alíquotas foram armazenadas em glicerol a 30%, a uma temperatura de -80°C. Para realização da contagem bacteriana, alíquotas destas culturas foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio BB solidificado com 1,5% de ágar bacteriológico. Após incubação por 72 horas a 37°C, foi possível determinar a concentração bacteriana presente na suspensão por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) visualizadas na placa.

3.3. INFECÇÃO

Os animais foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC da linhagem S2308 ou RB51 da bactéria *B. abortus* diluídas em 200µl de PBS. Após os tempos de infecção (24, 48, 72 e 168 horas), os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, para a retirada do baço e realização dos ensaios *ex vivo*.

3.4. LINHAGEM CELULAR

Os ensaios desenvolvidos nesse trabalho foram realizados em macrófagos murino pertencentes a linhagem RAW 264.7 (ATCC® TIB-71 TM), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar.

3.5. CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens RAW 264.7 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm³ (SARSTEDT) com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico e mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Periodicamente as células tinham seu crescimento e morfologia monitorados sendo que, de acordo com o índice mitótico, foram realizadas trocas do meio de cultura, havendo monitoramento até estas alcançarem confluência de aproximadamente 80%. Tal característica possibilitou que as células fossem então congeladas em meio apropriado de congelamento (90% SFB, 10% Dimetilsulfóxido (DMSO), VETEC), transferidas para garrafas de maiores dimensões (75 cm³, SARSTEDT) ou utilizadas nos ensaios.

Uma vez que as linhagens celulares utilizadas são aderentes, suportes plásticos (cell scraper – 71 SARSTED) foram utilizados para sua remoção do interior das garrafas.

3.6. MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS

O recrutamento dos macrófagos intraperitoneais foi realizado pela injeção intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato 3% estéril (GORDON, UNKELESS e COHN, 1974). Após 4 dias, os animais foram eutanasiados para a realização de uma lavagem peritoneal onde 5 mL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) gelado foram injetados e, em seguida, recolhidos com seringa. O líquido coletado do peritônio foi acrescido de PBS estéril até o volume final de 10 mL e submetido à centrifugação a 1500 RPM, por 10 minutos. As células obtidas foram ressuspensas em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5% de SFB e 1% de antibiótico. A concentração celular foi determinada utilizando-se em câmara de Neubauer com corante azul de tripan.

3.7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A quantidade de nitrito presente no sobrenadante das culturas estimuladas de células RAW 264.7 foi mensurada como um indicador da produção de NO por meio da Reação de Griess (GUEVARA et al., 1998). Para tanto, foram adicionadas 100 µL do sobrenadante das culturas tratadas a igual volume do Reagente de Griess. Em seguida, foi efetuada a incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de nitrito (NO₂⁻) nas amostras foi obtida por meio de curva padrão

3.8. CULTURA DE ESLENÓCITOS

O baço extraído de cada animal foi macerado em 10 mL de PBS, com o auxílio de uma peneira de aço. Após serem macerados foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 1500 RPM. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão ACK (Ammonium-Chloride-Potássium - 1% KHCO₃ e 8% NH₄Cl em água destilada) e incubadas por 5 minutos, a temperatura ambiente, ocorrendo a lise osmótica dos eritrócitos. Após a incubação, 28 mL de PBS foram acrescentados e seguiu-se nova centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e 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 µg/mL, GIBCO). Em seguida a concentração das células foi determinada na câmara de Neubauer.

As células foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células/poço em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC), submetidas a marcação e realização da citometria de fluxo.

3.9. DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Esplenócitos derivados de animais de animais infectados ou não foram cultivados conforme descrito acima e estimulados com o mitógeno Concanavalina A (5µg/ml- Sigma-Aldrich). Após 72 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com

5% de CO₂, o sobrenadante será retirado para a adição de 90 µl/poço de meio RPMI suplementado (10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e 10 µl/poço de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromido (MTT - Sigma-Aldrich), (5mg/ml). As células serão então novamente incubadas a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂ durante 4 horas. Após esse período, o sobrenadante será retirado para adição de 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido- Synth). A reação será avaliada em leitor de microplaca (Biorad) em comprimento de onda de 550 nm. O índice de proliferação será então calculado levando-se em conta a metabolização do MTT de células estimuladas e células não estimuladas.

3.10. CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES DE SUPERFÍCIE

Após serem mantidas em cultura (células RAW 254.7) ou serem coletadas (macrófagos intraperitoneais), as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripán (Sigma), e posteriormente transferidas para placas de 96 poços de fundo chato, na concentração de 5×10^5 células por poço (adaptado do estudo de Huo et al., 2012). As células foram então incubadas por 24 horas e posteriormente infectadas com MOI (MOI – do inglês, multiplicity of infection) de 50:1 (WEISS, D. S. *et al.*, 2005) das linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas as placas foram então centrifugadas por 5 minutos, 1500 Rpm, 4 °C e lavadas com solução estéril de tampão fosfato-salino (PBS- do inglês, phosphate buffered saline) acrescido de 1% de antibiótico. Foram então adicionados o estímulo lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* a 1 µg/mL (Sigma) como controle positivo e meio RPMI (GIBCO) administrado nas células não estimuladas sendo essas usadas como controle negativo. Após mais 24 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂ iniciou-se o processo de marcação celular. Com relação aos esplenócitos oriundos de animais infectados, o conteúdo celular foi obtido conforme descrito no item _____ e em seguida submetido a marcação celular.

Inicialmente, as placas contendo as células foram lavadas com 200 µl de tampão de FACS (PBS acrescido 1% de soro fetal bovino e 0,09% de azida (NaNO₃) gelado a fim de remover as células aderidas. Em seguida o conteúdo celular foi transferido para uma placa de fundo em “U” que foi então centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido por inversão rápida da placa.

O conteúdo celular foi então ressuspense em 200 µl de PBS e posteriormente centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante por inversão rápida da placa, as células receberam o marcador de viabilidade celular FVS (VER DADOS) na concentração de (VER DADOS) por poço. As células foram então incubadas por 15 minutos a 4°C. Poços que tiveram a morte celular induzida pela administração de DMSO na concentração de (VER DADOS) por poço durante 15 minutos foram utilizados como controle positivo na marcação com o corante de viabilidade celular visto que esse atua sob células inviáveis.

Posteriormente as placas contendo as células foram lavadas duas vezes com 200 µl de tampão de FACS gelado e após remoção do conteúdo por inversão rápida da placa, as células foram ressuspensas no volume residual e foram adicionados a cada poço 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpo de bloqueio anti- CD16/CD32 (Clone 93) na concentração de 0,3 µg por poço. O conteúdo celular foi então incubado por 15 minutos a 4°C e posteriormente foram adicionados 100 µl/poço de tampão de FACS seguido de centrifugação por 5 minutos, 1500 Rpm, 4 °C.

O sobrenadante foi então removido por inversão rápida da placa e as células foram ressuspensas no volume residual, sendo adicionado a cada poço 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de 0,3 µg por poço dos diferentes anticorpos de interesse, conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria (Becton & Dickinson).

Anticorpos	Clone	Fluorocromos
anti-CD80	Clone 16-10A1	APC
anti-CD86	Clone GL1	FITC
anti-MHC	Clone AF6-120	PE
anti-CD40	Clone 3/23	BV421
anti-PD-1/CD279	Clone J43	BV421
anti-CD39	Clone 24DMS1	PE
anti-CD73		APC
anti-CD25		
anti- CD16/CD32	Clone 93	APC

Posteriormente, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro e em seguida foram adicionados 100 µl/poço de tampão de FACS seguido de centrifugação por 5 minutos, 1500 Rpm, 4 °C, sendo esse procedimento realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em 150 µl de tampão de FACS e transferidas para tubos específicos para FACS (CORNING). As amostras foram coletadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 30.000 eventos foram adquiridos e os resultados foram analisados pelo software Flowjo.

A estratégia de gate utilizada para determinação dos fenótipos celulares consistiu inicialmente na retirada dos doublets, seguida da determinação da zona de demarcação celular de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos das célula alvo. As células viáveis foram então determinadas a partir da utilização do corante de viabilidade células VFS e a média de intensidade de fluorescência (MIF) destas células foi determinada.

3.11. CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MARCADOR INTRACELULAR FOXP3

Após serem extraídas e plaqueadas conforme o item___, células esplênicas foram submetidas a marcação intracelular com kit específico para FoxP3 (Mouse FoxP3 Buffer Set – Becton & Dickinson). Primeiramente as placas contendo as células foram centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa.e posteriormente as células foram então ressuspensas em 100µl de tampão de FACS (PBS com 1% de soro fetal bovino e 0,09% de azida (NaNO₃). Em seguida, as placas de cultura foram submetidas a nova centrifugação (1500 RPM, 10 minutos) e foram adicionados a cada poço, 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpos destiados a marcação de proteínas de superfície (tabela 1). Seguiu-se então uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e acrescentou-se 200 µl/poço de tampão de FACS seguida de centrifugação (1500 RPM, 10 minutos). O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200 µl do tampão de fixação (Fixation Buffer) e incubadas por 30 minutos a 4°C. Seguiu-se nova centrifugação a 1500 RPM por 5 minutos e remoção do sobrenadante. As células foram então ressuspensas em 200 µl de tampão de permeabilização (Permeabilization Buffer) pré-aquecido (37°C).

As placas contendo o conteúdo celular foram novamente centrifugadas (1500 RPM, 5 minutos), o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 200 µl de tampão de permeabilização pré-aquecido novamente e posteriormente foi realizada incubação por 30 minutos a 37°C. Em seguida, a placa foi submetida a nova centrifugação (1500 RPM, 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e foram adicionados a cada poço, 20µL de solução de tampão de FACS acrescida do anticorpo anti-FoxP3 (Clone MF23), com a marcação PE. Seguiu-se uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, foi acrescentado 200 µl/poço de tampão de FACS seguida de nova centrifugação (1500 RPM, 5 minutos), sendo esse procedimento realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em 250 µl de tampão de FACS e transferidas para tubos específicos para FACS (CORNING). As amostras foram lidas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 30.000 eventos foram adquiridos.

A estratégia de gate utilizada para determinação dos fenótipos celulares consistiu inicialmente na retirada dos doublets, seguida da determinação da zona de demarcação celular de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos das células alvo. As células viáveis foram então determinadas a partir da utilização do corante de viabilidade células VFS e a média de intensidade de fluorescência (MIF) destas células foi determinada.

3.12. CULTURA DE MACRÓFAGOS E PREPARO DE HOMOGENEIZADO CELULAR PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA WESTERN BLOTTING

Para qualificar a NTPDase CD39 foram utilizados macrófagos pertencentes a linhagem RAW 264.7 cultivados em garrafas de cultura de 25 cm³ (SARSTEDT) com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico e mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram então contadas, plaqueadas na concentração de 1 x 10⁷ e posteriormente infectadas e estimuladas conforme descrito anteriormente (item 3.4). Após 3 dias de cultura, as células foram tratadas com tripsina-EDTA (0,25% Sigma-Aldrich), coletadas e centrifugadas a 1500 Rpm por 10 minutos. Esse processo foi seguido por duas lavagens com PBS estéril e uma nova centrifugação.

As células foram então ressuspensas em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,4, com sacarose 8% e inibidores de proteases leupeptina (0,5 ug/ml), pepstatina (0,07

ug/ml), inibidor de tripsina (50 ug/ml) e fluoreto de fenilmetilsufonil (2 ug/ml). O rompimento da membrana celular e liberação de antígenos foram obtidos por meio de 5 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e 5 ciclos no UltraSonic Cleaner (Unique) por 10 minutos. O homogeneizado de células foi estocado a -20°C até o momento de uso. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.13. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CD39 PELA TÉCNICA WESTERN BLOTTING

As amostras de homogeneizado celular foram então solubilizadas em tampão de amostra, aquecidas por 5 minutos a 100°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com Laemmli (1970). Também foi aplicado um padrão de peso molecular pré-corado. A corrida foi realizada por cerca de 2 horas a 100 V em um sistema de eletroforese (Mini Protean III, BioRad). Uma parte do gel foi corada com Azul de Comassie (1% de azul de comassie R (m/v), 30% de ácido acético glacial e 40% de metanol) e as proteínas da outra parte foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Mini Trans-Blot III, BioRad). As membranas foram cortadas em poços, bloqueadas por 2 h com tampão fosfato (PBS) + 3% de caseína + Tween 20 0,1% e incubadas com o anticorpo anti-CD39 na diluição de 1:500. Os ensaios foram revelados por quimioluminêscia utilizando anticorpos secundários anti-IgG de coelho acoplado a peroxidase na diluição de 1:1000 (Bethyl Laboratories INC., Montgomery, TX, USA) e o luminol como substrato, seguido de exposição a filmes de raio-X, de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western blotting System; GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, Inc), sendo utilizado o teste - paramétrico ANOVA seguido do pós-teste Dunnet. O nível de significância adotado nas análises foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD80, CD86 E MHC II EM CÉLULAS RAW 264.7 INFECTADAS COM *B. abortus*

O reconhecimento de antígenos é um fator de suma importância para o desenvolvimento de respostas imunológicas frente a infecções e, nesse contexto, a expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) aliada a expressão de moléculas coestimulatórias desempenha papel fundamental na efetivação das respostas imunológicas (KHAN *et al.*, 2012). Dados descritos na literatura sugerem que diversos patógenos evadem das respostas imunológicas do hospedeiro através da redução da expressão de tais moléculas. Essa característica auxilia no escape de mecanismos de imunovigilância favorecendo dessa forma a cronicidade da infecção (TOBIAN *et al.*, 2003; ANTONIOU e POWIS, 2008).

Diferentes estudos têm sugerido que um dos mecanismos de evasão utilizado pela bactéria *Brucella* é a diminuição da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, bem como da molécula apresentadora MHCII. Esta redução poderia inibir a ativação de linfócitos T específicos e assim facilitar a sobrevivência do patógeno (HELLER *et al.*, 2012).

Para avaliar esta proposição, células RAW 264.7 foram cultivadas e infectadas com as linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *B. abortus*. Além disso, para determinar a intensidade da imunomodulação, células infectadas foram estimuladas com LPS de *E.coli*, a fim de induzir a expressão das moléculas em questão.

Conforme demonstrado nas figuras 4 e 5, o estímulo com LPS foi efetivo na indução da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 quando comparado a células não estimuladas (meio). De maneira interessante, a infecção com *B. abortus*, tanto da linhagem S2308 quanto da RB51, não foi capaz de aumentar a expressão dessas moléculas de maneira significativa. A estimulação de células infectadas restaurou a expressão das moléculas em questão sugerindo que a bactéria não é capaz de manter a imunomodulação na presença de outros estímulos.

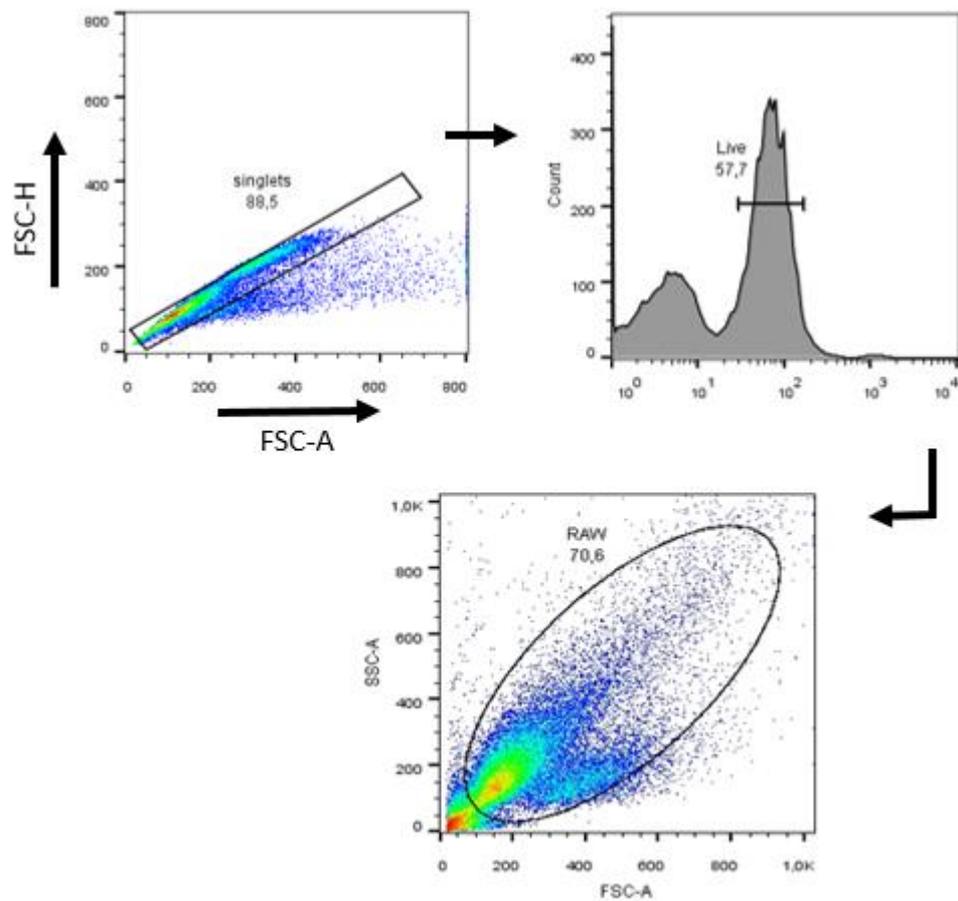


Figura 3: Estratégia de gate e eliminação da zona de macrófagos. Células pertencentes a linhagem de macrófagos RAW 264.7 foram mantidas em cultura, e após realização do protocolo de marcação da técnica de citometria de fluxo, as medidas de dispersão foram usadas para determinar as "Single cells". A população celular foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células, e através do marcador de viabilidade FVS 510 a população celular viável foi determinada. A média de intensidade de fluorescência (MIF) foi determinada com índice de 70,6%.

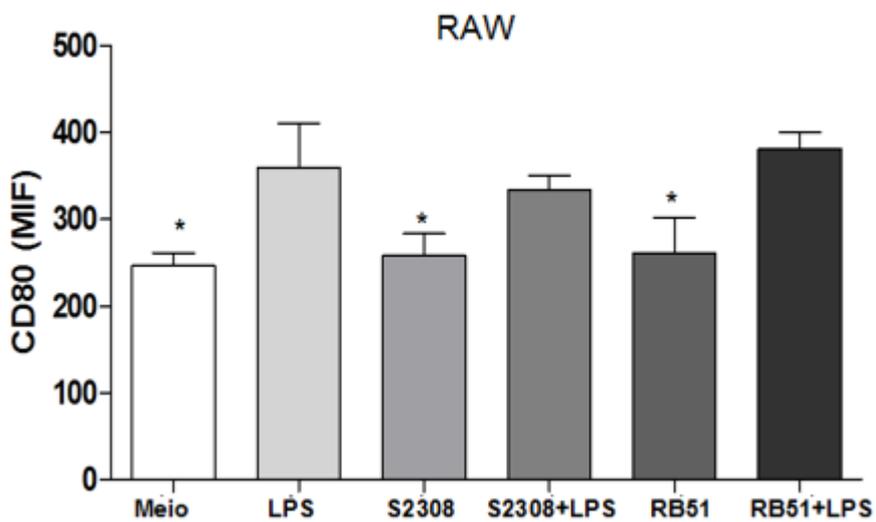
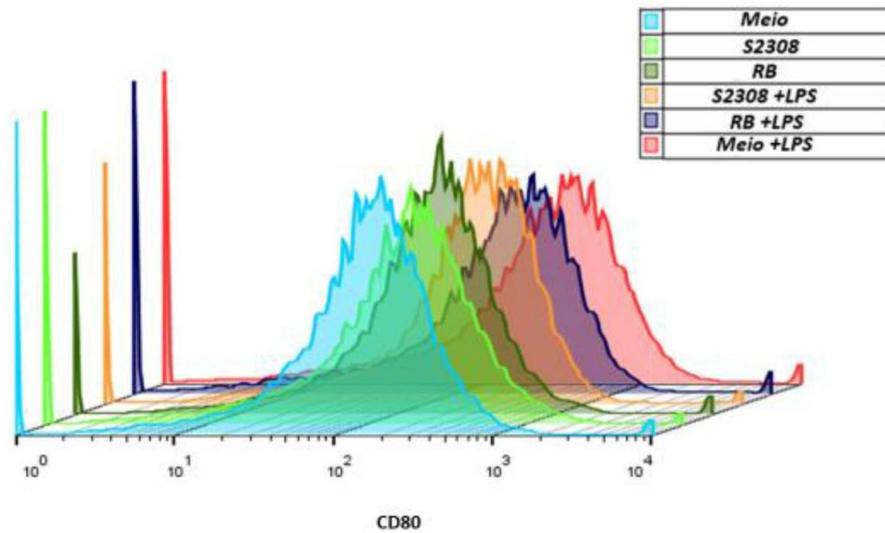


Figura 4: Análise da expressão de moléculas coestimulatórias CD80. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 das linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD80 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência, (B) Análise da expressão de CD80. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

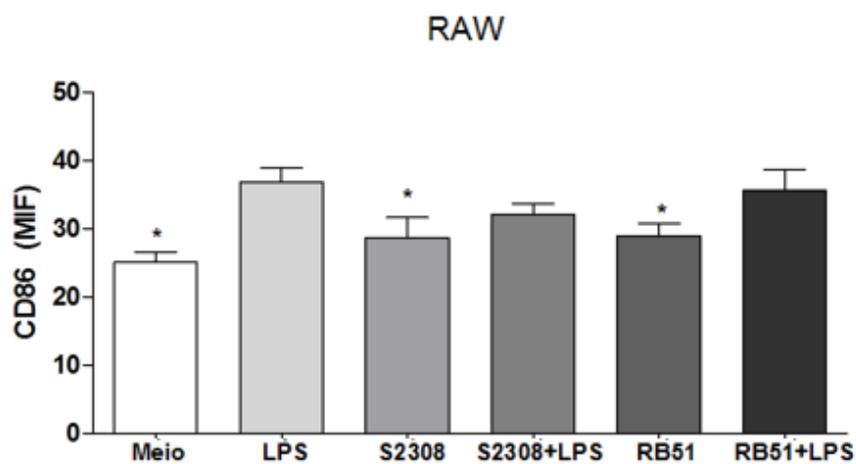
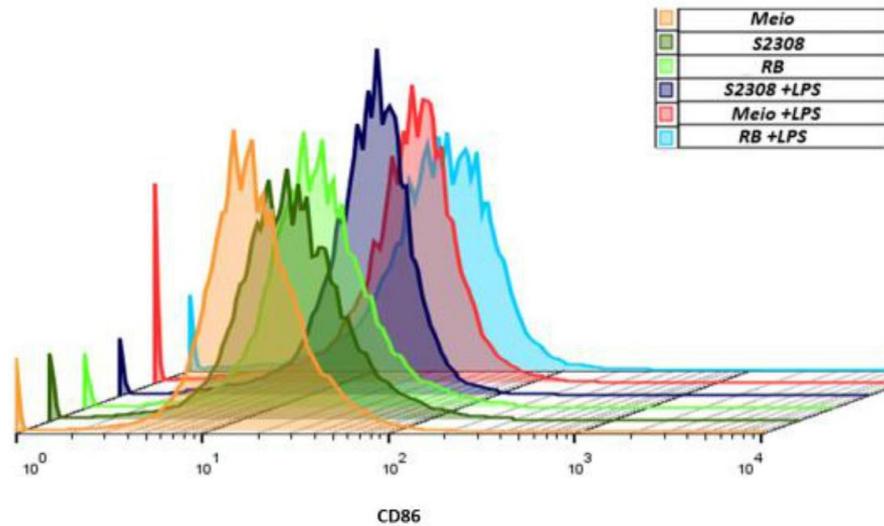


Figura 5: Análise da expressão de moléculas coestimulatórias CD86. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 das linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 μ g/mL de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD86 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência, (B) Análise da expressão de CD86. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

A avaliação da expressão das moléculas de MHCII evidenciou um perfil diferente do observado anteriormente. Conforme demonstrado na figura 6, a infecção com a bactéria não foi capaz de estimular significativamente a expressão de moléculas de MHCII.

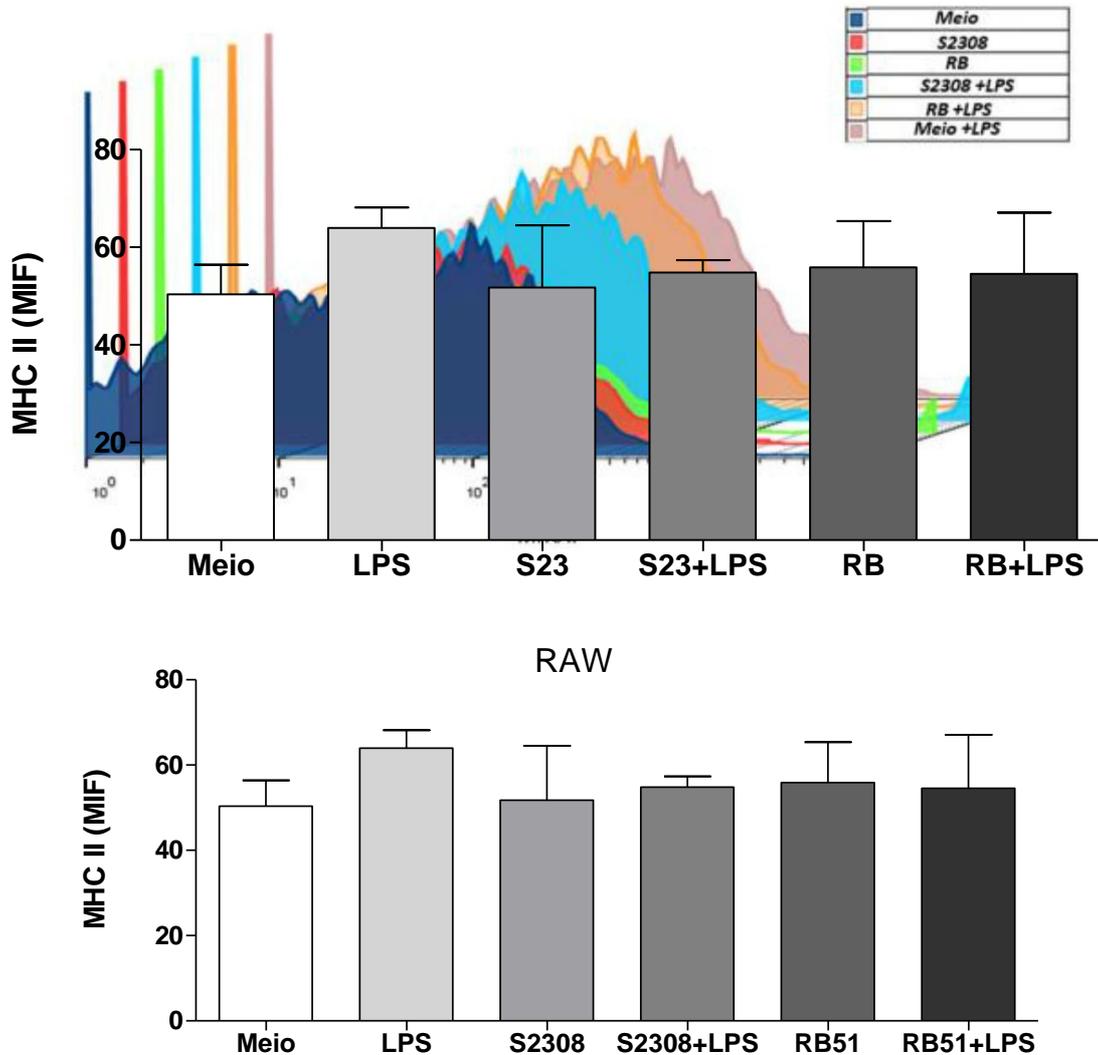
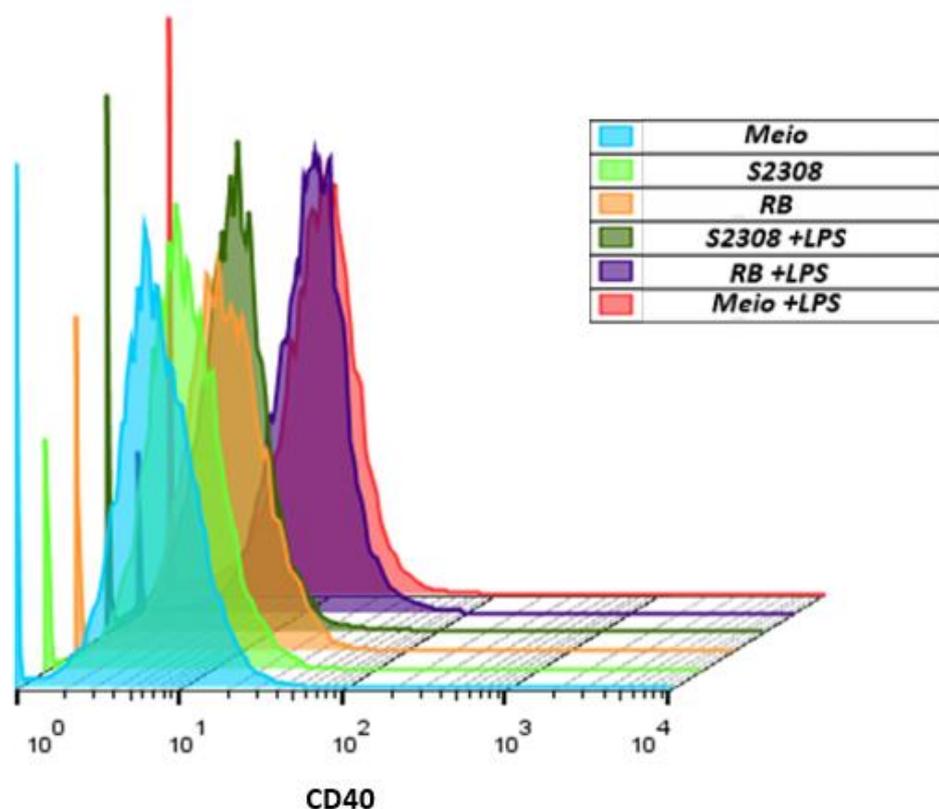


Figura 6: Análise da expressão de moléculas MHC II. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 das linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 μ g/mL de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de MHCII foi determinada por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência, (B) Análise da expressão de MHCII. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD40 EM CÉLULAS RAW 264.7 INFECTADAS COM *B. abortus*

Como já mencionado, a interação entre a molécula CD40 e seu ligante possui papel fundamental em processos imunológicos uma vez que, embora a ativação de células T possa ocorrer na ausência dessa via de sinalização, funções imunológicas como produção de citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias são ineficientes na sua ausência (ELGUETA *et al.*,2013). Desse modo, a fim de verificarmos o grau de ativação celular avaliamos a expressão da molécula CD40 em macrófagos RAW 264.7 infectados com a linhagem S2308 da bactéria *Brucella abortus*.

Conforme demonstrado nos gráficos da figura 7, o estímulo com LPS foi capaz de induzir aumento na expressão da molécula CD40 quando comparado ao controle negativo (meio). Em relação as células infectadas com a bactéria *Brucella abortus* foi observado que, em relação ao grupo estimulado com LPS, o patógeno em questão é capaz de modular negativamente a expressão desse marcador. Quando as células infectadas são estimuladas com LPS é vista uma elevação na expressão de CD40, sugerindo mais uma vez que o efeito modulador exercido pela bactéria não é mantido frente a outros estímulos.



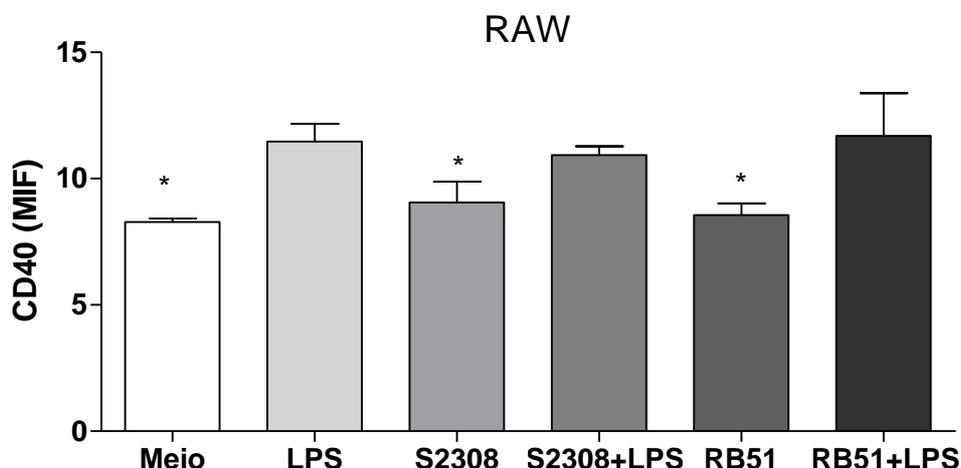


Figura 7: Avaliação da expressão de moléculas CD40. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD40 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência, (B) Análise da expressão de CD40.

* significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA PD-1 EM CÉLULAS RAW INFECTADAS COM *B. abortus*

A fim de verificarmos outras possíveis vias imunomodulatórias utilizadas pela bactéria *Brucella abortus*, avaliamos também a expressão da molécula PD-1 visto que esta molécula inibitória tem sido frequentemente associada ao perfil regulatório (BELKAID, 2007).

Conforme mostrado nos gráficos da figura 10, a infecção por *B. abortus* foi capaz de modular negativamente a expressão da molécula PD-1 de forma significativa quando comparada ao grupo controle positivo (LPS). De forma interessante, a média de intensidade de fluorescência (MIF) observada em células infectadas foi inferior inclusive ao apresentado pelo controle negativo (meio) e a modulação da expressão da molécula PD-1 também pode ser observada no grupo infectado e estimulado com LPS.

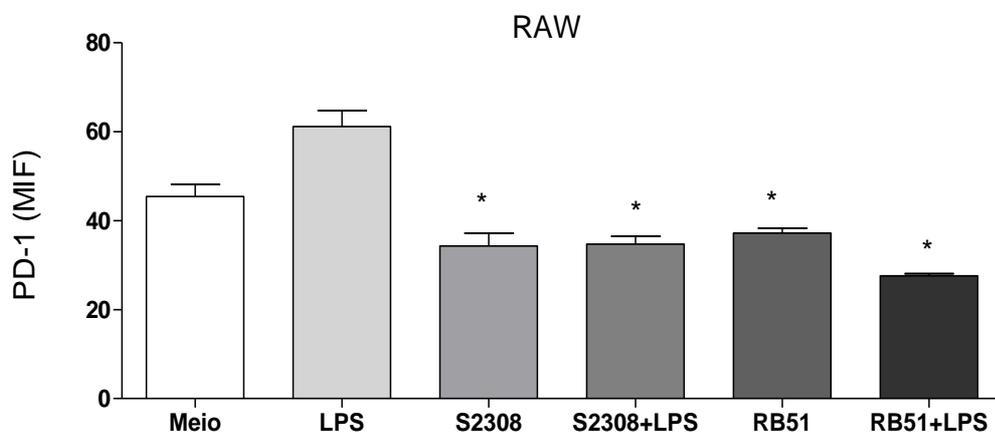
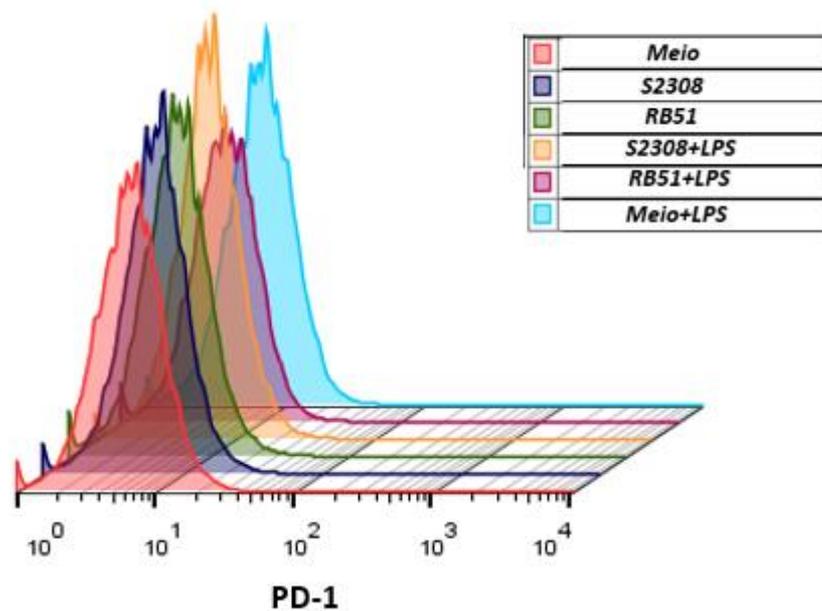


Figura 10: Avaliação da expressão de moléculas PD-1. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 μ g/mL de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de PD-1 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência, (B) Análise da expressão de PD-1.

* significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD39 POR WESTERN BLOTTING

Conforme mencionado anteriormente, sabe-se que diversos patógenos expressam naturalmente a NTPDase CD39 e utilizam dessa via para evadir das respostas imunológicas do hospedeiro favorecendo assim a progressão da infecção. Dessa forma, a fim de verificarmos a expressão dessa proteína na bactéria *B. abortus* e conseqüentemente avaliarmos a manipulação do fenótipo celular do hospedeiro frente a infecção com o patógeno em questão, avaliamos pela técnica de Western Blotting a expressão de CD39 na bactéria *B. abortus* e utilizamos como controle positivo macrófagos RAW 264.7

Conforme mostrado na figura 9, foi possível detectar a proteína alvo a aproximadamente 66 kDa, valor que corresponde a massa molecular da enzima NTPase-1/CD39 (FIETTO *et al.*, 2004). Os dados obtidos indicam que diferentemente dos macrófagos RAW 264.7 (figura 9/ banda 1), bactérias *B. abortus* S2308 não expressam a proteína em questão (figura 9/ bandas 2). Tais resultados indicam que a variação na expressão da NTPDase CD39 em células infectadas se deve a modificações induzidas pelo patógeno

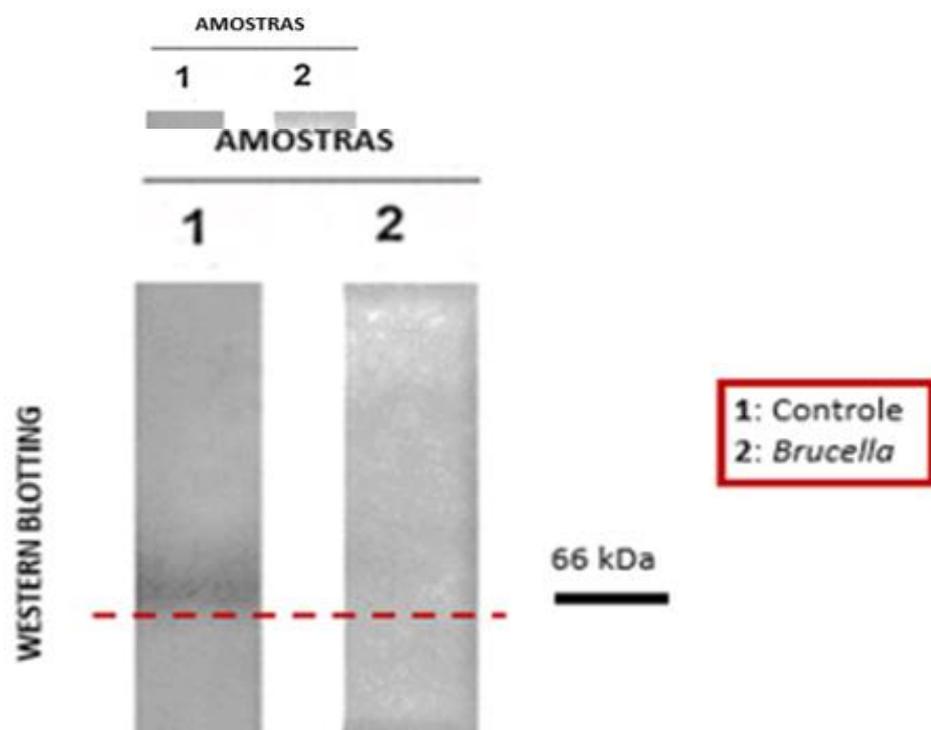


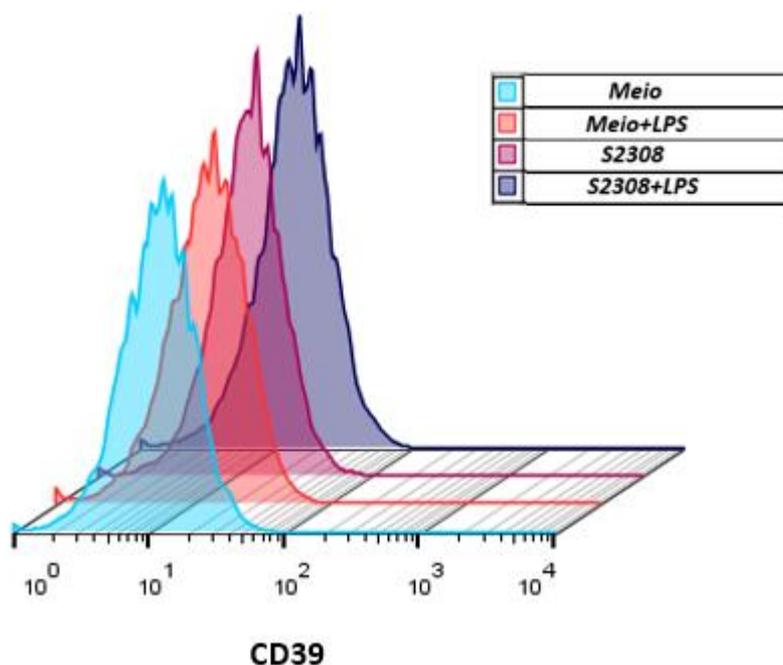
Figura 9: Identificação da NTPDase 1/ CD39 em macrófagos pela técnica de Western blotting.

Alíquotas contendo proteínas extraídas de homogeneizado de células foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e

incubados com anticorpos anti-CD39 na diluição de 1:500. Em (1) controle positivo RAW 264.7; (2) Bactéria *Brucella abortus* S2308.

5.5. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD39 EM CÉLULAS RAW 264.7 INFECTADAS POR *B. abortus*

Uma vez que a infecção por *Brucella* foi capaz de inibir a expressão dos coestimuladores CD80 e CD86, CD40 e PD-1, avaliamos se esta imunomodulação está relacionada ao aumento da expressão da NTPDase CD39. Conforme demonstrado nos gráficos da figura 8, de forma surpreendente, foi percebida redução significativa na expressão do marcador CD39 em células infectadas quando comparadas ao controle positivo (LPS). Essa redução também é evidenciada no grupo celular infectado e estimulado com LPS embora de maneira menos efetiva. Estes resultados sugerem que a diminuição na expressão dos coestimuladores (figuras 4 e 5) em resposta a infecção por *B. abortus* não está relacionada ao aumento da expressão de CD39.



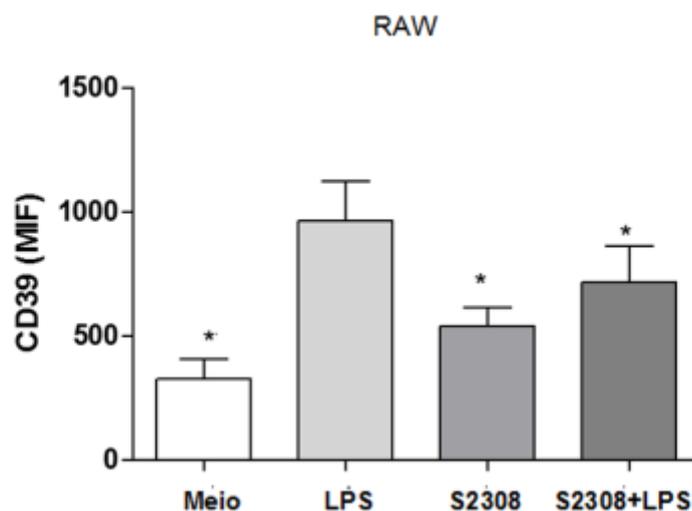


Figura 8: Análise da expressão de moléculas CD39. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD39 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência, (B) Análise da expressão de CD39.

* significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.6. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD73 EM CÉLULAS RAW 264.7 INFECTADAS POR *B. abortus*

Uma vez que a ectonucleotidase CD73 também desempenha importante papel na resposta imunomodulatória, nós avaliamos sua expressão frente a infecção com a bactéria *B. abortus*. Conforme apresentado na figura 12, a bactéria em questão não foi capaz de estimular de forma significativa a expressão da molécula CD73 em células infectadas e/ou infectadas e estimuladas com LPS.

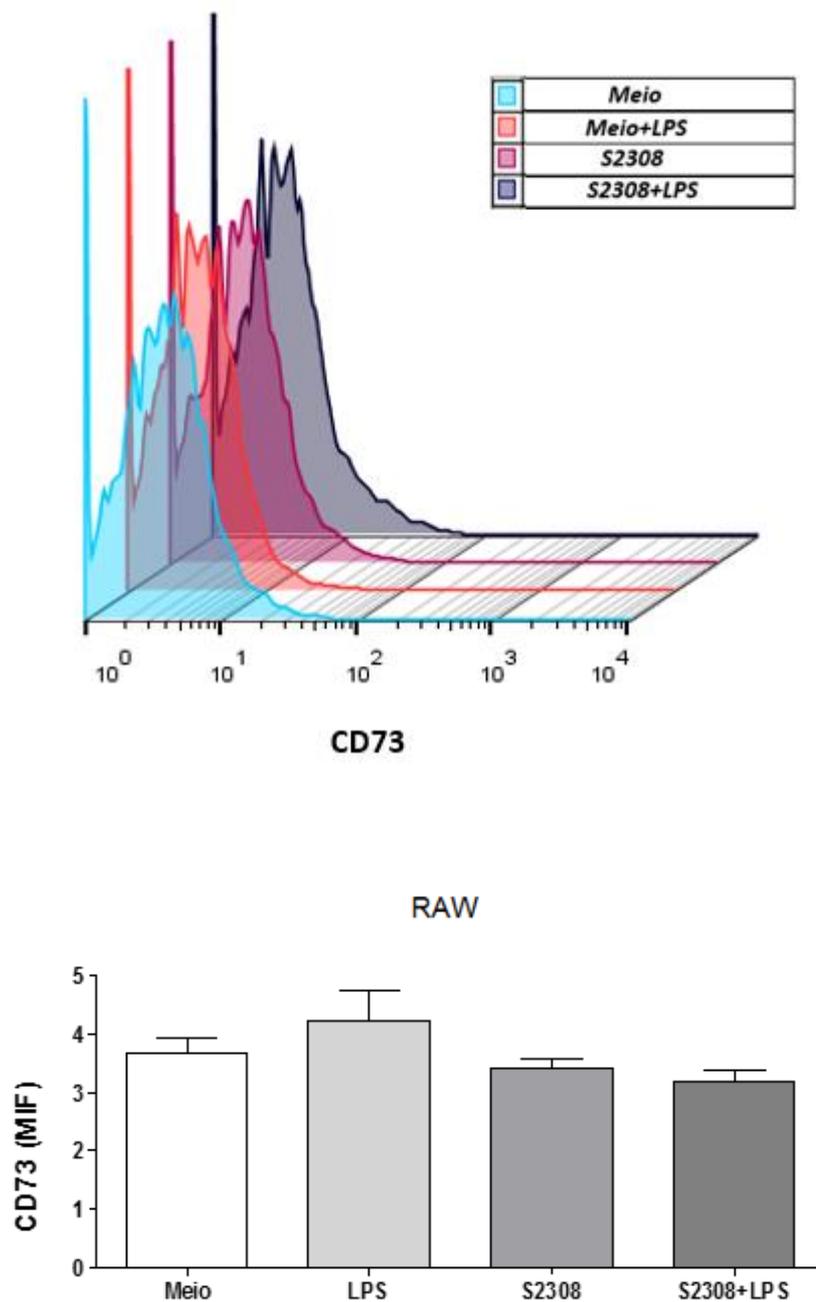


Figura 12: Análise da expressão de moléculas CD73. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD73 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da intensidade de fluorescência, (B) Análise da expressão de CD73.

* significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS RAW 264.7 INFECTADAS POR *B. abortus*

Visto que o óxido nítrico é uma molécula sintetizada por diferentes tipos celulares e participa de diversas funções fisiológicas incluindo o combate a patógenos (BOGDAN, ROLLINGHOFF e DIEFENBACH, 2000), nós avaliamos a produção desse composto através de análises no sobrenadante das células RAW 264.7 infectadas e infectadas e estimuladas com LPS de *Escherichia coli*.

Como apresentado na figura___, vimos que a infecção com *B. abortus* foi capaz de promover aumento significativo da produção de NO em células RAW 204.7 quando comparado com controle positivo (LPS). Tal variação foi vista também em células infectadas e estimuladas com LPS.

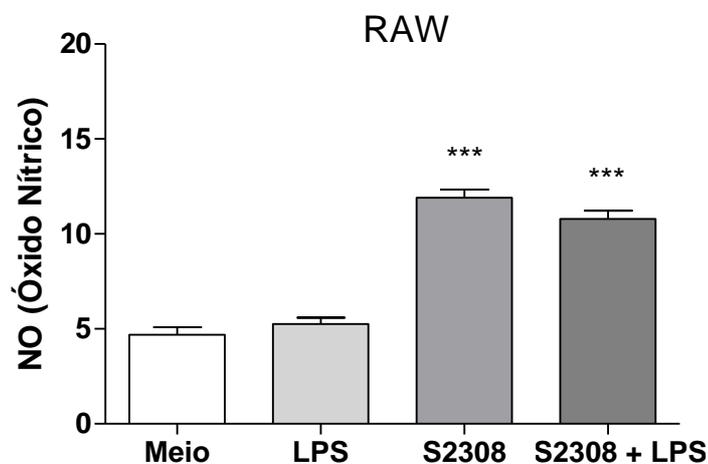


Figura 12: Determinação da produção de óxido nítrico em células Raw 264.7 infectadas com *B. abortus*. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a produção de NO foi determinada por meio da Reação de Griess. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.8. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD80, CD86 E MHC II EM MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS INFECTADOS COM *B. abortus*

A fim de avaliarmos a expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 bem como das moléculas de MHC II em outras populações celulares da imunidade inata, verificamos a expressão desses marcadores em macrófagos intraperitoneais

24 horas após a infecção. Para isso, macrófagos foram coletados, cultivados e infectados com as linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *B. abortus*. Visando determinar a intensidade da imunomodulação, células infectadas foram estimuladas com LPS de *E.coli*, a fim de induzir a expressão das moléculas em questão.

A partir da estratégia de gate utilizada em nossas análises, visando selecionar células maduras capazes de induzir proliferação de linfócitos T, foram selecionadas células com expressão elevada do marcador CD11b (CD11b^{hi}). Como apresentado na figura 13, o estímulo com LPS foi efetivo na indução da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 quando comparado a células não estimuladas (meio). Vimos também que a infecção com *B. abortus*, tanto da linhagem S2308 quanto da RB51, não foi capaz de aumentar a expressão dessas moléculas de maneira significativa. Assim como em células RAW 264.7, vimos que a estimulação de células infectadas restaurou a expressão das moléculas em questão sugerindo que a bactéria não é capaz de manter a imunomodulação na presença de outros estímulos.

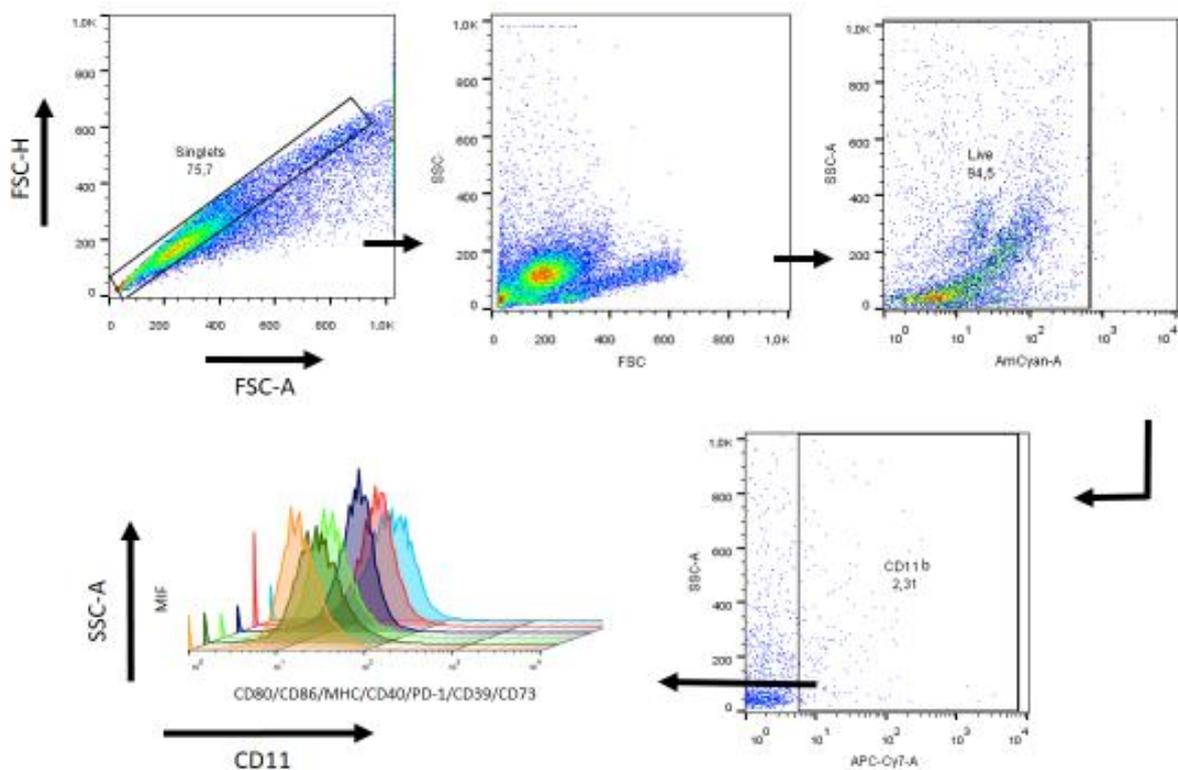


Figura 3: Estratégia de gate e determinação da zona de células CD11b^{hi}. Macrófagos intraperitoneais foram coletados e mantidos em cultura. Após realização do protocolo de marcação da técnica de citometria de fluxo, as medidas de dispersão foram usadas para determinar as "Single cells". A população celular foi então demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade

(SSC) característicos destas células, e através do marcador de viabilidade FVS 510 a população celular viável foi determinada. A média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada marcador de superfície celular foi então avaliada.

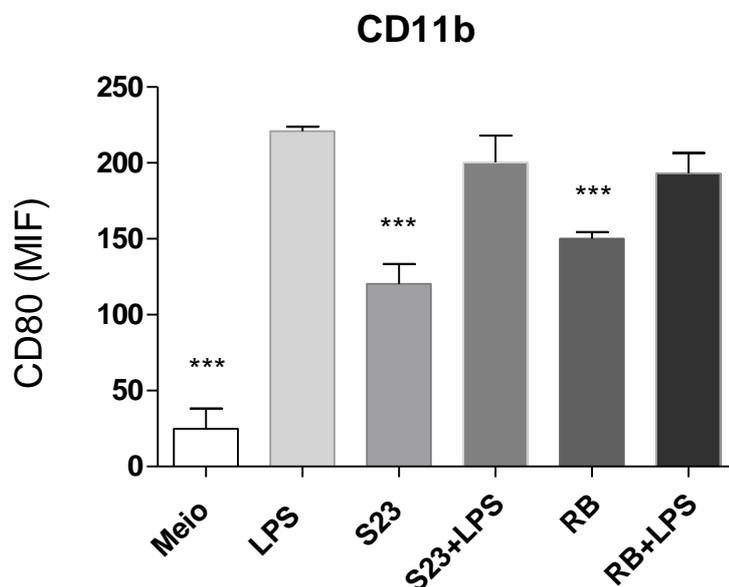


Figura 4: Análise da expressão de moléculas coestimulatórias CD80. Macrófagos intraperitoneais (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 das linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD80 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Análise da expressão de CD80. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet)

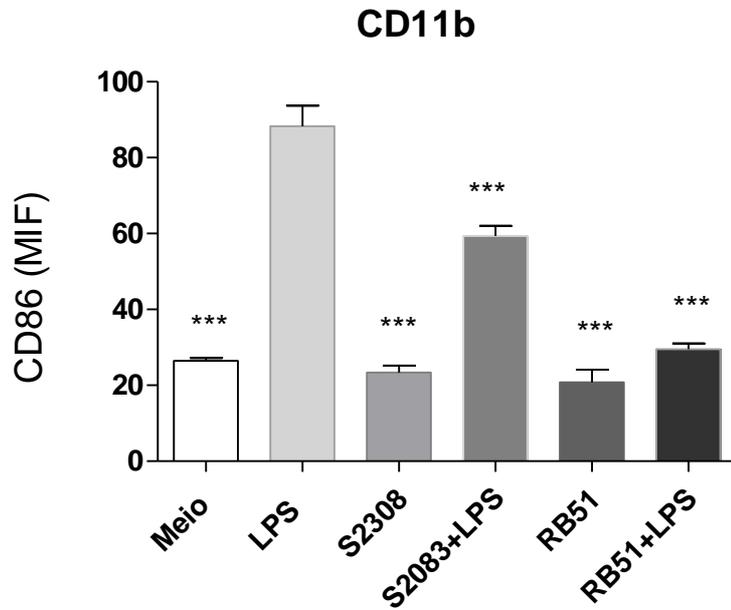


Figura 5: Análise da expressão de moléculas coestimulatórias CD86. Macrófagos intraperitoneais (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 das linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD86 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Análise da expressão de CD86. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet)

Como relação as moléculas de MHCII, verificamos que a infecção com ambas linhagens da bactéria *B. abortus* não foi capaz de estimular significativamente sua expressão.

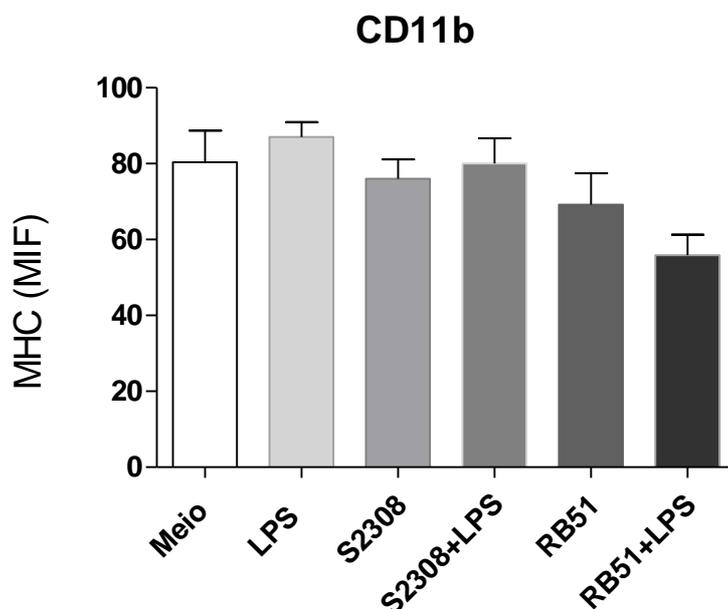


Figura 6: Análise da expressão de moléculas MHC II. Macrófagos intraperitoneais (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 das linhagens S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de MHCII foi determinada por citometria de fluxo. (A) Análise da expressão de MHCII. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD40 EM MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS INFECTADOS COM *B. abortus*

A fim de verificarmos se a redução observada nas moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 possui relação com uma possível variação na expressão de CD40, avaliamos a intensidade de fluorescência dessa molécula em macrófagos intraperitoneais com expressão elevada do marcador CD11b (CD11b^{hi}).

Como mostrado na figura 15, o estímulo com LPS foi capaz de induzir aumento na expressão da molécula CD40 quando comparado ao controle negativo (meio). Vimos também que tanto as células infectadas com *B. abortus* quanto as infectadas e estimuladas com LPS apresentaram redução significativa quando comparadas ao controle positivo (LPS).

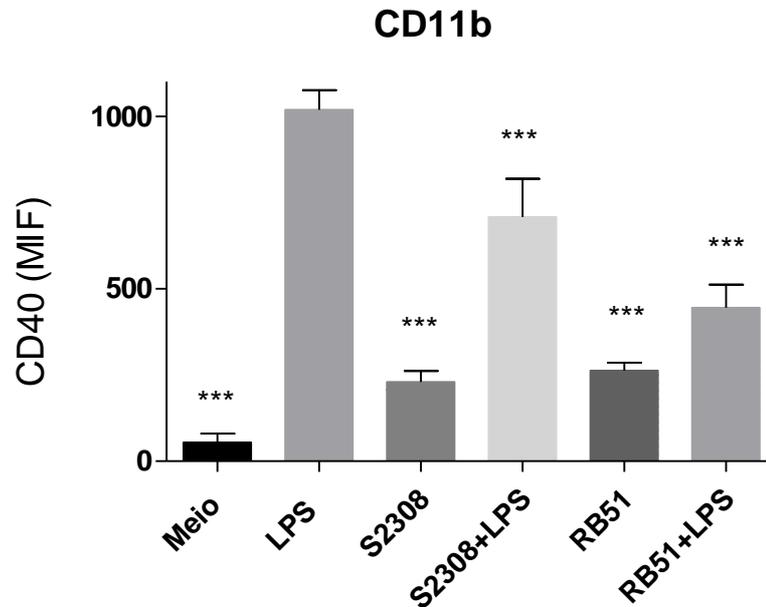


Figura 7: Avaliação da expressão de moléculas CD40. Macrófagos intraperitoneais (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD40 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Análise da expressão de CD40. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.10. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA PD-1 EM MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS INFECTADOS COM *B. abortus*

Visando avaliar a participação da molécula PD-1 no perfil imunomodulatório induzido em células da imunidade inata pela infecção com a bactéria *B. abortus*, verificamos a expressão do marcador em questão também em células com elevada expressão de CD11b (CD11b^{hi}) obtidas a partir do lavado peritoneal de camundongos da linhagem C57BL6. Conforme apresentado no gráfico 16, a infecção foi eficaz na modulação negativa da expressão da molécula PD-1 quando comparada ao grupo controle positivo (LPS). De forma similar ao perfil observado em células RAW 264.7, a expressão desse marcador em células infectadas foi inferior inclusive ao apresentado pelo controle negativo (meio). A modulação da expressão da molécula PD-1 também pode ser observada no grupo infectado e estimulado com LPS

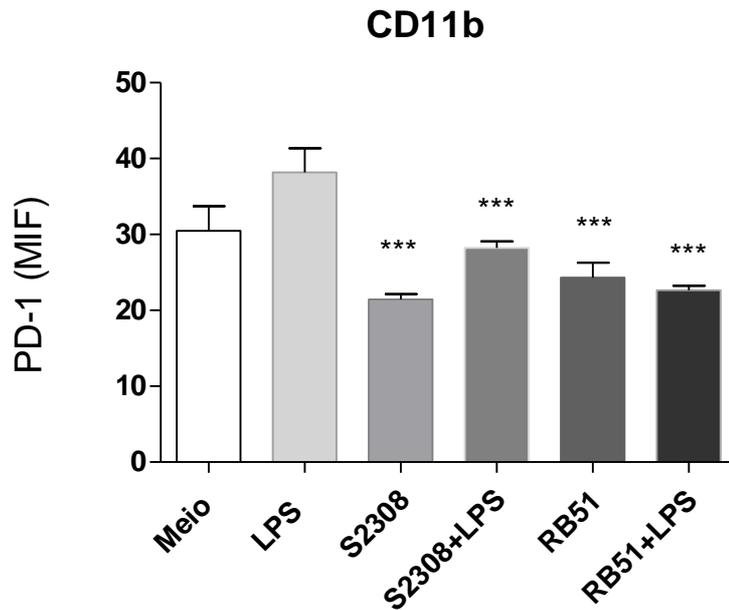


Figura 7: Avaliação da expressão de moléculas PD-1. Macrófagos intraperitoneais (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de PD-1 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Análise da expressão de PD-1. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.11. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ECTO-NUCLEOTIDASES CD39 E CD73 EM MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS INFECTADOS COM *B. abortus*

A fim de avaliarmos o papel das ecto-nucleotidases CD39 e CD73 em macrófagos intraperitoneais, verificamos a intensidade de fluorescência desses marcadores em células com elevada expressão de CD11b (CD11b^{hi}) obtidas a partir do lavado peritoneal de camundongos da linhagem C57BL6. Como apresentado na figura 17, vimos que, assim como observado em macrófagos RAW 264.7, houve redução significativa na expressão do marcador CD39 em células infectadas quando comparadas ao controle positivo (LPS).

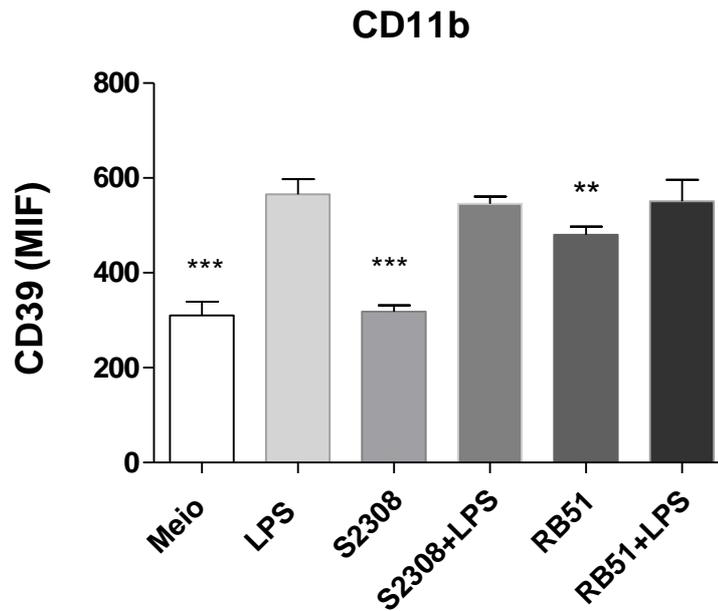


Figura 7: Avaliação da expressão de moléculas CD39. Macrófagos intraperitoneais (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD39 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Análise da expressão de CD39. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

Com relação a expressão da ecto-nucleotidase CD73 (figura 18) não houve variação significativa nos grupos infectados e infectados e estimulados com LPS.

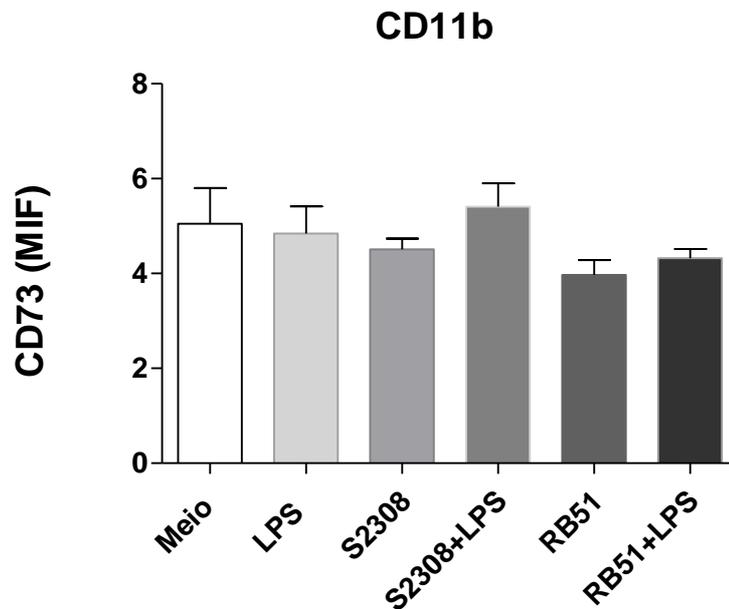


Figura 7: Avaliação da expressão de moléculas CD73. Macrófagos intraperitoneais (5×10^5 /poço) foram infectados com MOI de 50:1 da linhagem S2308 ou RB51 da bactéria *Brucella abortus*. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e estimuladas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli*. Como controle foram utilizadas células não infectadas e não estimuladas (meio) e células estimuladas somente com LPS. Após 24 horas, a expressão de CD73 foi determinada por citometria de fluxo. (A) Análise da expressão de CD73. * significativo em relação ao controle estimulado com LPS ($P < 0,05$ Anova/Dunnet).

5.12. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS PD-1, CD39 E CD73 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS CD11C^{hi} ESPLÊNICAS APÓS 24 HORAS DE INFECÇÃO COM BACTÉRIA *B. abortus*

Sabendo que a resposta imunológica a patógenos intracelulares facultativos como a *Brucella* se dá essencialmente através de respostas mediadas por células, sendo a ativação de macrófagos e células dendríticas fundamentais no processo de eliminação do patógeno (BALDWIN e GOENKA, 2006), nós avaliamos através de um modelo experimental *ex vivo*, o perfil de moléculas com caráter imunomodulador em células dendríticas (CD11c^{hi}) esplênicas após 24 horas de infecção com a bactéria *B. abortus*

Com relação a expressão da molécula PD-1 (figura__), vimos que frente a infecção com *B. abortus* há redução significativa desse marcador.

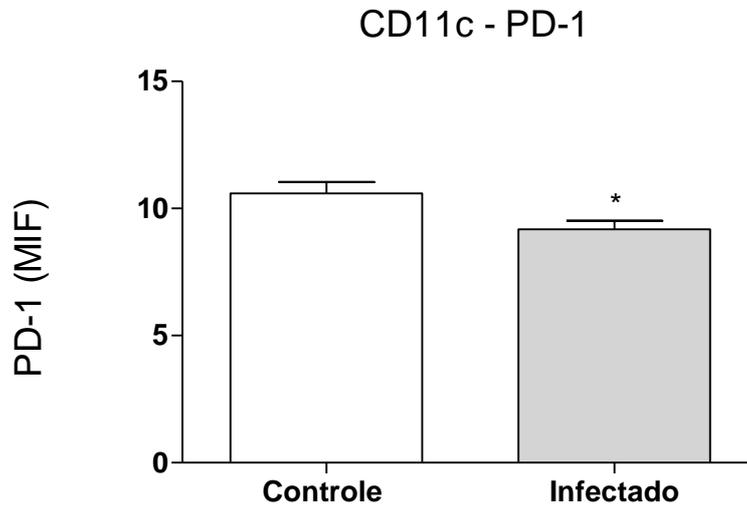


Figura 5. Avaliação da expressão de moléculas PD-1 em animais infectados com *B. abortus*. Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal), (n=4 por grupo). Após 24 horas de células do baço destes animais foram retiradas e a expressão de PD-1 foi determinada por citometria de fluxo. Como controles foram utilizados células provenientes de animais não infectados. (A) Análise da expressão de PD-1. * significativo em relação ao controle ($P < 0,05$. Teste t de student).

A expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 também foi avaliada. De acordo com os gráficos apresentados nas figuras __ e __, vimos que ambos marcadores não apresentaram variações significativas na população de células dendríticas esplênicas CD11c^{hi}.

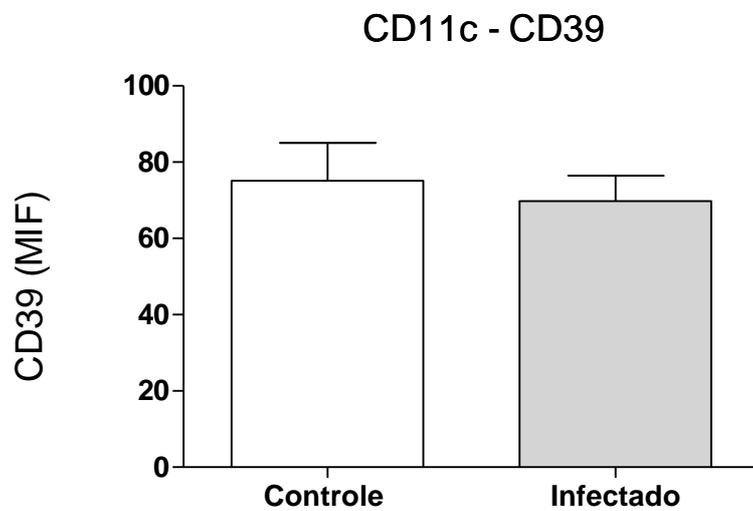


Figura 5. Avaliação da expressão de moléculas CD39 em animais infectados com *B. abortus*. Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal), (n=4 por grupo). Após 24 horas de células do baço destes animais foram retiradas e a expressão de CD39 foi determinada por citometria de fluxo. Como controles foram utilizados células provenientes de animais não infectados. (A) Análise da expressão de CD39. * significativo em relação ao controle ($P < 0,05$. Teste t de student).

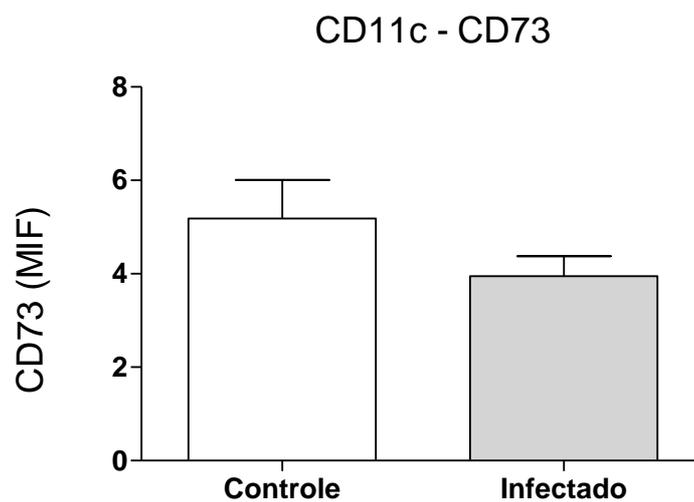


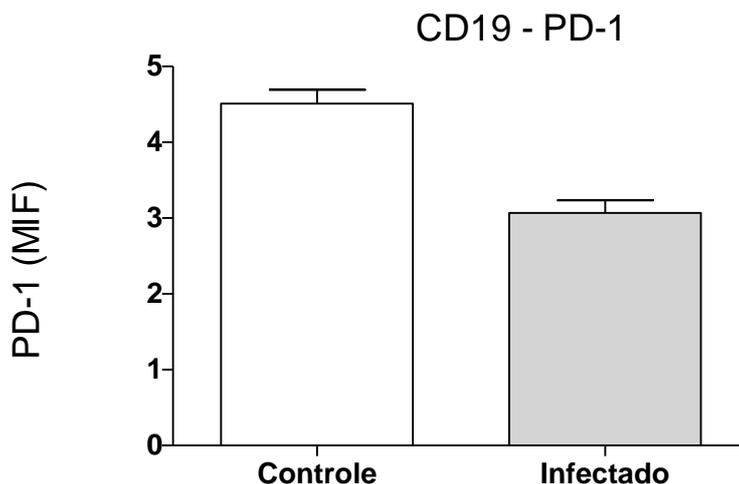
Figura 5. Avaliação da expressão de moléculas CD73 em animais infectados com *B. abortus*. Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal), (n=4 por grupo). Após 24 horas de células do baço destes animais foram retiradas e a expressão de CD73 foi determinada por

citometria de fluxo. Como controles foram utilizados células provenientes de animais não infectados. (A) Análise da expressão de CD73. * significativo em relação ao controle ($P < 0,05$. Teste t de student).

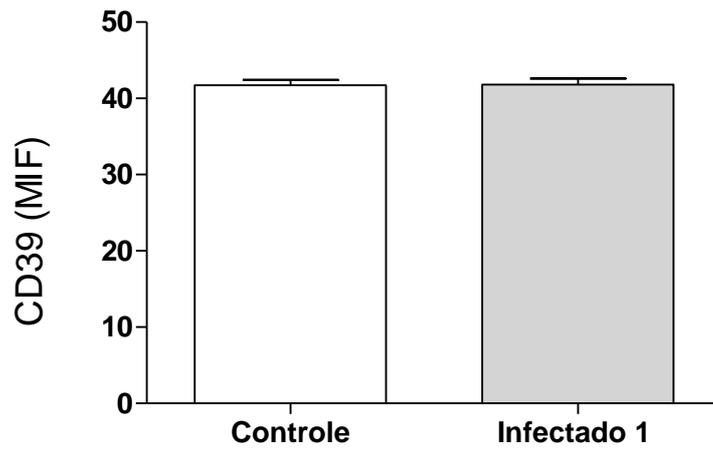
5.13. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS PD-1, CD39 E CD73 EM CÉLULAS B CD19^{HI} ESPLÊNICAS APÓS 24 HORAS DE INFECÇÃO COM BACTÉRIA *B. abortus*

Sabe-se que as células B apresentam importante papel na infecção por *Brucella*. Em 2012, Goenka e colaboradores demonstraram que tanto *in vivo* quanto *in vitro* a progressão da infecção com esse patógeno é favorecida por células B uma vez que esse tipo celular representa um importante nicho para replicação dessa bactéria, além de exercer papel imunomodulador frente a infecção com *B. abortus*. Visto isso, avaliamos a influencia desse microrganismo sobre a expressão de moléculas com caracter imunomodulador em células B CD29^{hi} esplênicas 24 horas após a infecção.

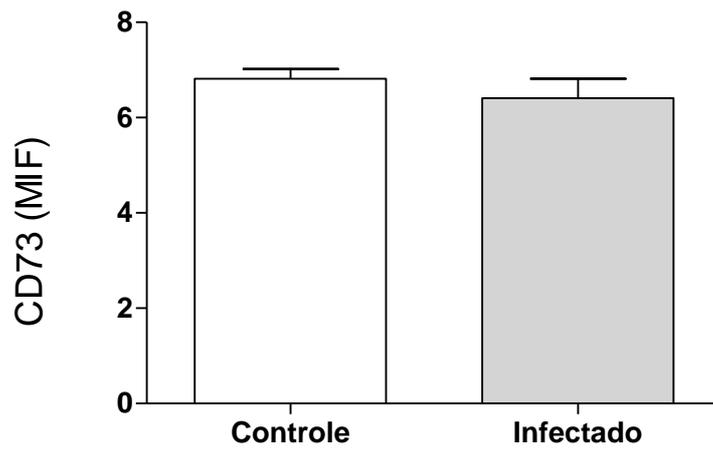
Como mostrado nos gráficos das figuras ____, vimos que após 24 horas de infecção a bactéria *B.abortus* não foi eficaz na modulação das moléculas com perfil regulatório analisadas.



CD19 - CD39



CD19 - CD73



5. DISCUSSÃO

Conforme dito anteriormente, as bactérias do gênero *Brucella* são patógenos responsáveis por causar a brucelose, caracterizada como uma doença infectocontagiosa que acomete o homem e uma grande variedade de animais domésticos (NICOLETTI, 1989), resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção

Sabe-se que a resposta imunológica a bactérias desse gênero ocorre essencialmente através da imunidade mediada por células, sendo macrófagos especialmente importantes no combate à infecção (BALDWIN e GOENKA, 2006). Entretanto, apesar da efetividade da resposta, a *B. abortus* conta com diversos mecanismos de evasão, o que garante a sua sobrevivência no organismo hospedeiro (RAJASHEKARA *et al.*, 2006).

Visando verificar algumas possíveis vias imunomodulatórias utilizadas pela bactéria *B. abortus*, inicialmente avaliamos a expressão das moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), e MHCII em células RAW 264.7 após 24 horas de infecção

Já foi bastante elucidado na literatura o papel das moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) na geração de uma resposta imunológica efetora no combate a patógenos. Embora a interação do TCR com moléculas de MHC seja capaz de iniciar uma resposta de célula T a antígenos específicos, sabe-se que um segundo sinal é necessário para a expansão clonal de linfócitos T, além da efetivação na produção de citocinas como a IL-2. (ARTIGO 2017)

Sabe-se que os marcadores CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) são predominante expressos na superfícies de células apresentadoras de antígeno (APCs) – dendríticas, macrófagos e linfócitos B – ativadas e que a interação dessas moléculas com o receptor CD28 expresso em linfócitos T fornece importante sinal coestimulatório responsável pela efetivação da resposta imunológica. Já foi descrito também que a expressão dessas moléculas é aumentada após estímulos fornecidos pelo próprio antígeno, citocinas e pela interação da molécula CD40 ao seu respectivo ligante. (ARTIGO 2017)

Aliado a isso, estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a sinalização via CD80 promove preferencialmente o desenvolvimento de células com perfil T_H1, enquanto moléculas CD86 favorecem o desenvolvimento de células T_H2 (HELLER *et al.*, 2012). Tais dados evidenciam a importância dos marcadores em questão na ativação, expansão clonal e mudança de perfil linfocitário.

Sabendo a relevância dos macrófagos na resposta imune contra patógenos intracelulares e dadas as notáveis variações na expressão das moléculas CD80 e CD86 apresentadas em nosso estudo, nossos resultados sugerem que a redução observada em ambos marcadores pode acarretar a diminuição da capacidade de macrófagos RAW 264.7 infectados estimular linfócitos T, atuando negativamente na efetivação das respostas imunológicas e, conseqüentemente, favorecendo a persistência da infecção bacteriana.

Visto que a infecção com *B. abortus* é capaz de reduzir significativamente a expressão de moléculas coestimulatórias em macrófagos RAW 264.7, avaliamos se essa variação apresenta correlação com a expressão da molécula CD40 já que tal marcador também está relacionado a efetividade da resposta imune a patógenos (ELGUETA *et al.*,2013).

Sabe-se que a interação de CD40- CD40L além de atuar na ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos contra agentes intracelulares, também é fundamental na regulação das respostas imunológicas essencialmente em virtude de sua atuação sobre APCs, amplificando sua capacidade em apresentar antígenos (GREWAL, 1995 - REFERENCIAR).

Como apresentado na figura ____, a infecção com *B. abortus* foi capaz de modular negativamente a expressão de CD40, sugerindo que o patógeno é capaz de interferir nessa via de sinalização e conseqüentemente alterar a estimulação de células das APCs. Desse modo, a sobrevivência do patógeno pode ser favorecida, levando a cronicidade da infecção.

Uma vez que verificamos com a bactéria *B. abortus* é capaz de regular negativamente a expressão de moléculas com caráter coestimulatório, passamos então a verificar se essa redução observada pode ser relacionada ao aumento da expressão de moléculas regulatórias.

Conforme mencionado anteriormente, a molécula PD-1 tem sido associada a modulação da resposta imunológica. Em nossas análises da expressão desse marcador (figura____), de forma surpreende, vimos que frente a infecção com *B. abortus* houve redução significativa na expressão de PD-1 inclusive com relação ao valor apresentado pelo controle negativo (meio).

Sabe-se que essa molécula é encontrada em células T, células B, macrófagos e células mieloides ativadas, porém não é expressa em células não ativadas (GREENWALD, FREEMAN e SHARPE, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2008.). Especificamente em macrófagos, tem sido evidenciado que a expressão de PD-1

está associada a ativação dos receptores do tipo Toll que induzem a ativação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias, de maneira dependente do fator de transcrição NFκ- B (BALLY *et al.*, 2015). Sendo assim, seria coerente pensar que o reconhecimento dos PAMPs presentes na bactéria poderia ativar os receptores do tipo Toll e assim induzir uma maior expressão de PD-1. Apesar disso, embora *B. abortus* seja efetivamente reconhecida por diversos receptores do tipo Toll (OLIVEIRA *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2005; MACEDO *et al.*, 2008; COPIN *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2013), já foi demonstrado que este patógeno é capaz de interferir na via de sinalização executada por estes receptores e, conseqüentemente, a ativação e translocação de NFκ- B (SENGUPTA *et al.*; 2010) Sendo assim, podemos inferir que a diminuição na expressão de PD-1 encontrada no presente estudo, mesmo após a estimulação com LPS, pode estar relacionada à menor ativação celular dependente da via de sinalização dos TLRs e NFκ- B.

Outra via imunomodulatória utilizada por alguns patógenos é a manipulação de enzimas responsáveis pelo metabolismo extracelular de nucleotídeos, como a CD39 e CD73.

Inicialmente o papel fisiológico proposto para a NTPDase CD39 em células imunológicas foi o de proteção contra efeitos potencialmente líticos do ATP (FILIPPINI, TAFFS e SITKOVSKY, 1990). O conceito do papel fisiológico da CD39 foi aprofundado posteriormente com a descoberta de que a hidrólise do ATP por NTPDases é necessária para a secreção de citocinas do tipo 1 por linfócitos, tais como o IFN- γ e IL-2 (LANGSTON *et al.*, 2003).

Nesse contexto, se o fenômeno da redução de CD39 também ocorrer em linfócitos infectados, este seria um importante mecanismo de evasão, uma vez que levaria a diminuição da produção de IFN- γ que, conforme mencionado previamente, é uma citocina chave no controle desta infecção.

A redução na expressão de moléculas CD39 frente a infecção com *B. abortus* observada tanto nos ensaios de citometria de fluxo (figura 8) quanto no Western Blotting (figura 9) indica que, diferentemente do que ocorre frente a infecções com outros patógenos, a bactéria *Brucella abortus* induz diminuição na expressão de CD39 possivelmente a fim de favorecer o sucesso da infecção via inibição da produção de citocinas do tipo 1.

Tais observações aliadas ao dado mencionado anteriormente que aponta a molécula CD39 como um importante marcador de ativação de células linfóides (DWYER *et al.*, 2007), sugerem que a infecção poderia interferir tão profundamente

na fisiologia da célula que influenciaria na expressão de moléculas relacionadas a ativação (CD80, CD86 e CD40). Neste contexto, a queda da expressão de CD39 seria apenas um efeito colateral do impedimento da ativação celular e não um mecanismo de evasão do patógeno

CD39 - Estes resultados sugerem que a diminuição na expressão dos coestimuladores (figuras 4 e 5) em resposta a infecção por *B. abortus* não está relacionada ao aumento da expressão de CD39.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados preliminares obtidos até o momento, foi possível confirmar que a infecção com *B. abortus* interfere ativamente na expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 bem como na molécula CD40, indicando a existência de um mecanismo de evasão tanto da imunidade inata quanto da ativação da imunidade adquirida. Apesar disso, a redução na expressão destes marcadores não foi correlacionada com um aumento na expressão da NTPDase CD39 ou da molécula PD-1, visto que ambas também estão reduzidas após a infecção.

Nossos dados sugerem ainda que a bactéria age principalmente inibindo a ativação da célula hospedeira visto que tanto a molécula CD39 quanto PD-1 são expressos somente em células ativada.

6. PERSPECTIVAS

Avaliar em macrófagos o efeito da ectonucleotidase CD73 na imunomodulação causada por bactérias do gênero *Brucella*;

Avaliar a influência das moléculas CD39, CD73 e PD-1 na imunomodulação induzida pela *Brucella* em Células Dendríticas e linfócitos B.

Avaliar a produção das citocinas IL-10 e TGF- β por células da imunidade inata frente a infecção com *B.abortus*;

Caracterizar em células T os mecanismos de ação e o efeito imunomodulador desempenhado pela bactéria *B.abortus* através da avaliação da expressão das moléculas PD-1, CTLA-4, LAP e LAG-3, além do fator de transcrição FoxP3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO M.P; BURNSTOCK, G; BOEYNAEMS, J.M; BARNARD, E.A; BOYER, J.L; KENNEDY, C; FUMAGALLI, M; KING, B.F; GACHET, C; JACOBSON, KA; WEISMAN, GA. 2006. International Union of Pharmacology LVIII. Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacological Reviews** **58**:281–341.

ALP, E.; DOGANAY, M. 2008. Current therapeutic strategy in spinal brucellosis. **International Journal of Infectious Diseases**, **12 (6)**: 573-577.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M.1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. **Institut National de la Recherche Agronomique**, 190.

ALVES, A.J.S.; VILLAR, K.S. 2011. Brucelose bovina e sua situação sanitária no Brasil. **Conselho Regional de Medicina Veterinária, São Paulo**, **9(2)**: 12-17.

ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E.S.; HASKÓ, G. 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**,**19(6)**: 355–367.

ANTONIOU, A.N.; POWIS, S.J. 2008. Pathogen Evasion Strategies for the Major Histocompatibility Complex Class I Assembly Pathway. **Immunology**, **124 (1)**: 1–12.

ARÉSTEGUI, M. B.; GUALTIERI, S. C.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, O. G. 2001. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Veterinaria México**,**32**: 131-139.

ARIZA, J.; BOSILKOVSKI, M.; CASCIO, A.; COLMENERO, J.D.; CORBEL, M.J.; FALAGAS, M.E.; MEMISH, Z.A.; ROUSHAN, M.R.H.; RUBINSTEIN, E.; SIPSAS, N.V.; SOLERA, J.; YOUNG, E.J.; PAPPAS, G. 2007. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. **PLoS Medicine**, **4 (12)**: 1872-1878.

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, C.S.2006.Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, **36**: 217–222.

BALDWIN, C.L; GOENKA, R. 2006. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? **Critical reviews in immunology**, **26(5)**:407-442.

BELKAID, Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature reviews Immunology**, **7(11)**:875-888.

- BILLARD, E.; DORNAND, J.; GROSS, A. 2007. *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. **Infection and Immunity**, **75**: 4980–4989.
- BALLY, A.P.; LU, P.; TANG, Y.; AUSTIN, J.W.; SCHARER, C.D.; AHMED, R.; BOSS, J.M. 2015. NF- κ B regulates PD-1 expression in macrophages. **Journal of Immunology**, **194(9)**:4545-54.
- BIRON, C.A. 1999. Initial and innate responses to viral infections—pattern setting in immunity or disease. **Current Opinion in Microbiology**, **2**: 374–381.
- BOURS, M. J., SWENNEN, E. L., DI VIRGILIO, F., CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacological Therapy**. **112**: 358–404.
- BRABLETZ, T; PFEUFFER, I; SCHORR, E; SIEBELT, F; WIRTH, T; SERFLING, E. 1993. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. **Journal of Molecular Cell Biology**, **13(2)**:1155-62.
- BRASIL. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). **Brasília: MAPA/SDA/DAS**, 188.
- BROWN, J.A.; DORFMAN, D.M.; MA, F.R.; SULLIVAN, E.L.; MUNOZ, O.; WOOD, C.R.; GREENFIELD, E.A.; FREEMAN, G.J. 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **Journal of Immunology**, **170(3)**:1257-66.
- BURNSTOCK, G. 2012. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **Bioessays** **34**: 218–225.
- CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. 2006 *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, **5**: 13.
- CARVALHO, M.S.; BARROSO, M.R.; PINHAL, F.; TAVARES, F.M. 1995. Brucelose: Alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, **2**: 259-261.
- CHRISTOPHER, S.; UMAPATHY, B L; RAVIKUMAR, K L. 2010. Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. **Journal of laboratory physicians**, **2 (2)**: 55-60.

COELHO-CASTELLO, A.A.M; TROMBONE, A.P.F; ROCHA, C.D; LORENZI, J.C.C. 2009. Resposta imune às doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirao Preto),42:127-42.**

COPIN, R.; DE BAETSELIER, P.; CARLIER, Y.; LETESSON, J.J.; MURAILLE, E. 2007. MyD88 dependent activation of B220⁺CD11b⁺LY-6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. **Journal of Immunology, 178:** 5182-5191.

CORBEL, M. J. 1997. Brucellosis: an Overview. **Emerging Infectious Diseases, 2:** 213-221.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. 1992. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos.** 2. Ed: 213-215.

DE MARCO, R.; KOWALTOWSKI, A.T.; MORTARA, R.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2003. Molecular characterization and immuno-localization of *S. mansoni* ATPdiphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 307:** 831-838.

DEURLOO, E.E; TANIS, P.J; GILHUIJS, K.G; MULLER, S.H; KROGER, R; PETERSE, J.L; RUTGER, E.J; VALDES OLMOS, R; SCHULTZE KOOL, L.J.2003. Reduction in the number of sentinel lymph node procedures by preoperative ultrasonography of the axilla in breast cancer. **European Journal of Cancer, 39(8):** 1068–1073.

DWYER, K. M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T.B.; ROBSON, S.C. 2007. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling, 3:** 171–180.

EKICI, M. A.; OZBEK, Z.; GOKOGLU, A.; MENKU, A. 2012. Surgical Management of Cervical Spinal Epidural Abscess Caused by *Brucella Melitensis*: Report of Two Cases and Review of the Literature. **Journal of Korean Neurosurgical Society, 51 (6):** 383-387.

ELGUETA, R.; BENSON, M.J.; VRIES, V.C.; WASIUK, A.; GUO, Y.; NOELLE, R.J. 2013. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. **Immunological Reviews, 229(1):**10.1111.

FALLARINO, F; GROHMANN, U; HWANG, K.W; ORABONA, C; VACCA, C; BIANCHI, R. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nature Immunology, 4:**1206-1212.

FANNI, F.; SHAHBAZNEJAD, L.; POURAKBARI, B.; MAHMOUDI, S.; MAMISHI, S. 2013. Clinical manifestations, laboratory findings, and therapeutic regimen in hospitalized children with brucellosis in an Iranian Referral Children Medical Centre. **Journal of Health, Population, and Nutrition, 31 (2):** 218-222.

FEUERER, M; HILL, J.A; MATHIS, D; BENOIST, C. 2009. Foxp3+ Regulatory T Cells: Differentiation, Specification, Subphenotypes. **Nature Immunology**, **10(7)**: 689–695.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; SITKOVSKY, M.V.1990. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **87(21)**:8267-71.

FIETTO, J.L.; DE MARCO, R.; NASCIMENTO, I.P.; CASTRO, I.M.; CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M.T.; ALVES, M.J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2004. Characterization and immunolocalization of na NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **316(2)**:454-60.

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

FRANCO, M. P.; MULDER, M.; GILMAN, R. H.; SMITS, H. L. 2007. Human Brucellosis. **Infectious Diseases**, **7**: 775-786.

FRANZ, D. R.; JAHRLING, P.B.; FRIEDLANDER, A.M.; MCCLAIN, D.J.; HOOVER, D.L.; BRYNE, W.R.; PAVLIN, J.A.; CHRISTOPHER, G.W.; EITZEN, E.M. 1997. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. **Jornaul of the American Medical Association**, **278 (5)**: 399–411.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; LINDEN, J.; MÜLLER, C. 2011. Nomenclature and classification of adenosine receptors-an update. **Pharmacological Reviews** **63**: 1–34.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J. J. 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. **Veterinary Research**, **10**: 2014-707.

GOENKA, R.; GUIRNALDA, P.D.; BLACK, S.J.; BALDWIN, C.L. 2012. B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. **The Journal of Infectious Diseases**, **206(1)**:91-8.

GOMEZ, G.; SITKOVSKY, M.V. 2003. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. **Blood**, **102(13)**:4472.

GREENFIELD, R. A.; DREVETS, D.A.; MACHADO, L.J.; VOSKUHL, G.W.; CORNEA, P.; BRONZE, M.S. 2002. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. **American Journal of the Medical Sciences**, **323**: 299–315.

GREENWALD, R.J.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. 2005. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, **23**:515-48.

GUTIERREZ, F. R. S. 2009. **Papel do co-receptor PD-1 (“Programmed Cell Death Receptor 1”) na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***. Dissertação de Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HAMIDZADEH, K.; MOSSER, D.M. 2016. Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. **Frontiers in Immunology**, **7**:74.

HASKÓ, G.; PACHER, P. 2012. Regulation of macrophages function by adenosine. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **32(4)**:865-9

HE, Y. 2012. Analyses of *Brucella* pathogenesis, hostimmunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. **Frontiers in Cellular and Infection microbiology**, **2**: 1-33.

HELLER, M.C.; WATSON, J.L.; BLANCHARD, M.T.; JACKSON, K.A.; STOTT, J.L.; TSOLIS, R.M. 2012. Characterization of *Brucella abortus* infection of bovine monocyte-derived dendritic cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **149(3-4)**:255-61.

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, **5**: 971–974.

HUANG, L.Y.; ISHII, K.J.; AKIRA, S.; ALIBERTI, J.; GOLDING, B. 2005. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. **Journal of Immunology**, **175**: 3964-3970.

HUANG, L. Y.; REIS E SOUSA, C.; ITOH, Y.; INMAN, J.; SCOTT, D.E. 2001. IL-12 induction by a TH1- inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. **Journal of Immunology**, **167 (3)**: 1423-1430.

HUANG, X.; VENET, F.; WANG, Y.L.; LEPAPE, A.; YUAN, Z.; CHEN, Y.; SWAN, R.; KHEROUF, H.; MONNERET, G.; CHUNG, C.S.; AYALA, A. 2009. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **106(15)**:6303-8.

IDAF, 2011. Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo. **Boletim Epidemiológico – Brucelose – Nº2**, 10 de Dezembro de 2011.

IDZKO, M.; FERRARI, D. & ELTZSCHIG, H. K. 2014. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**, **509**: 310-317.

IVANENKOV, V.V.; MURPHY-PIEDMONTE, D.M.; KIRLEY, T.L. 2003. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. **Biochemistry**, **42**:11726–11735.

JANEWAY, C. A. JR.; MEDZHITOV, R. 2002. Innate immune recognition. **Annual Reviews of Immunology**, **20**: 197–216.

JACOBSON, K.A.; JAYASEKARA, M.P. & COSTANZI, S. 2012. Molecular Structure of P2Y Receptors: Mutagenesis, Modeling, and Chemical Probes. **Wiley Interdisciplinary Reviews Rev Membrane Transport Signaling**, **1(6)**.

JIN, X.; SHERPHERD, R.K.; DULING, B.R.; LINDEN, J. 1997. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. **Journal of Clinical Investigation**, **100**:2849–2857.

JONG, M. F.; ROLAN, H. G.; TSOLIS, R. M. 2010. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. **Cellular microbiology**, **12 (9)**: 1195-120.

KAWAI, T.; AKIRA, S. 2007. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, **19**: 24-32.

KHAN, N.; GOWTHAMAN, U.; PAHARI, S.; AGREWALA, J.N. 2012. Manipulation of Costimulatory Molecules by Intracellular Pathogens: Veni, Vidi, Vici!! **PLOS Pathogens**, **8 (6)**: 1002676.

KÖLES, L.; FÜRST, S. & ILLES, P. 2007. Purine Ionotropic (P2X) Receptors. **Current Pharmaceutical Design**, **13**: 2368-2384.

KOZIAK, K.; SEVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; SIEGEL, J.B.; KACZMAREK, E. 1999. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression. In endothelial cells, platelets and leukocytes. **The Journal of Thrombosis and Haemostasis**, **82(5)**:1538-44.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. 2008. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, **32**: 202-212.

LANGSTON, H.P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.T; DOMBROWSKI, K.E.; KAPP, J.A. 2003. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, **170**: 2962-2970.

LECHNER, O.; LAUBER, J.; FRANZKE, A.; SARUKHAN, A.; VON-BOEHMER, H.; BUER, J. 2001. Fingerprints of anergic T cells. **Current Biology**, **11(8)**:587-95.

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

MAIOLI, T.U.; TAKANE, E.; ARANTES, R.M.; FIETTO, J.L.; AFONSO, L.C. 2004. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. **The Journal Parasitology Research**, **94(3)**:207-12.

MALISZEWSKI, CR; DELESPESE, GJ; SCHOENBORN, MA, ARMITAGE, RJ; FANSLAW, WC; NAKAJIMA, T; BAKER, E; SUTHERLAND, GR.; POINDEXTER, K; BIRKS, C. 1994. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **The Journal of Immunology**, **153(8)**: 3574-83.

MANTUR, B. G.; AMARNATH, S. 2008. Brucellosis in India. **Journal of Biosciences**, **33 (4)**: 539-547.

MATSUMOTO, K.; FUKUYAMA, S.; EQUCHI-TSUDA, M.; NAKANO, T.; MATSUMOTO, T.; MATSUMURA, M.; MORIWAKI, A.; KAN-O, K.; WADA, Y.; YAGITA, H.; SHIN, T.; PARDOLL, D.M.; PATCHAREE, R.; AZUMA, M.; NAKANISHI, Y.; INOUE, H. 2008. B7-DC induced by IL-13 works as a feedback regulator in the effector phase of allergic asthma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **4;365(1)**:170-5.

MELERO, I.; GRIMALDI, A.M.; PEREZ-GRACIA, J.L.; ASCIERTO, P.A. 2013. Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination. **Clin Cancer**, **19**:997–1008.

MEMISH, Z.; MAH, M. W.; AL MAHMOUD, S.; AL SHAALAN, M.; KHAN, M. Y. 2000. *Brucella* bacteremia: clinical and laboratory observations in 160 patients. **Journal of Infection**, **40 (1)**: 59-63.

MINHARRO, S. 2009. **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil** Tese de Doutorado em Ciência Animal – Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R, L.; O’GARRA, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Reviews of Immunology**, **19**: 683–765.

MURPHY, E.A; SATHIYASEELAN, J; PARENT, M.A; ZOU, B; BALDWIN, C.L. 2001. Interferongamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. **Immunology**, **103(4)**: 511-51.

MURPHY-PIEDMONTE, D.M.; CRAWFORD, P.A.; KIRLEY, T.L. 2005. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39I4) ectonucleotidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1747**: 251–259.

NICOLETTI, P. 2002. A short history of brucellosis. **Veterinary Microbiology**, **90**:5-9.

NICOLETTI, P. 1989. Relationship between animal and human disease.1989. **Brucellosis: Clinical and laboratory aspects**, 41-51.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; NICOLETTI, P. 2004. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, **100**: 25-30.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. 2009. Bovine brucellosis. Terrestrial **Animal Health**, 11.3.

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**, **10**: 1005-1009

OLIVEIRA, S.C.; SPLITTER, G.A. 1995. CD8+ type CD44hi Cd45 RBIO T lymphocytes intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrates in major histocompatibility complex class II and class II deficiente mice. **European Journal of Immunology**, **25(9)**:2551-7.

PAJUABA, A. C. A. M. 2006. **Avaliação de frações hidrofóbicas e hidrofílicas de *Brucella abortus* em ensaios imunoenzimáticos para caracterizar o perfil de anticorpos produzidos por bovinos vacinados e não-vacinados**. Dissertação de Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E.V. 2006^a. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infection Diseases**, **6 (2)**: 91-99.

PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; BOSILKOVSKI, M.; TSIANOS, E. 2005. Brucellosis. **The New England Journal of Medicine**, **352**: 2325-2336.

PAPPAS, G.; PANAGOPOULOU, P.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. 2006b. *Brucella* as a biological weapon. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **63 (19-20)**: 2229– 2236.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. 2007. Challenges in *Brucella* bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **30**: S29 - S31.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. 2006. Aspectos higiênicosanitários da carne. Zoonoses mais comuns adquiridas profissionalmente por manipuladores de carne. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**, **2**: 358-359.

PARRY, R.V.; CHEMNITZ, J.M.; FRAUWIRTH, K.A.; LANFRANCO, A.R.; BRAUNSTEIN, I.; KOBAYASHI, S.V.; LINSLEY, P.S.; THOMPSON, C.B.; RILEY, J.L. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, **25(21)**:9543-53

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO J. S. 2003 **O Combate à Brucelose Bovina: situação brasileira**.154.

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. 2008. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, **75**: 389-401.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. 2003. Brucelose: Uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, **10 (2)**: 91-100.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. 2009. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **61**: 1-5.

PROBERT, W.S.; SCHRADER, K. N.; KHUONG, N. Y.; BYSTROM, S. L.; GRAVES, M. H. 2004. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella spp.*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of clinical microbiology**, **42**: 290-1293.

RAJASHEKARA, G.; ESKRA, L.; MATHISON, A.; PETERSEN, E.; YU, Q.; HARMS, J.; SPLITTER, G. 2006. *Brucella*: functional genomics and host-pathogen interactions. **Animal Health Research Reviews**, **7 (1-2)**: 1-11.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Review**, **50**:413–92.

RAMBOW-LARSEN, A. A.; PETERSEN, E. M.; GOURLEY, C. R.; SPLITTER, G. A. 2009. *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. **Trends in Microbiology**, **17 (8)**: 371-377.

REDKAR, R., ROSE, S., BRICKER, B., DELVECCHIO, V. 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and cellular probes**, **15**: 43-52.

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. 2008. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, **32**: 83-92.

ROBSON, S.C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure, function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, **2**:409-430.

SALCEDO, S.P.; MARCHESINI, M.I.; LELOUARD, H.; FUGIER, E.; JOLLY, G.; BALOR, S.; MULLER, A., LAPAQUE, N.; DEMARIA, O.; ALEXPOULOU, L.; COMERCI, D.J.; UGALDE, R.A.; PIERRE, P.; GORVEL, J.P. 2008. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. **PLOS Pathogens**, **8**;4(2): 21.

SARAIVA, M; O'GARRS, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, **10(3)**:170-81.

SATHIYASEELAN, J.; GOENKA, R.; PARENT, M.; BENSON, R.M.; MURPHY, E.A.; FERNANDER, D.M.; FOULKES, A.S.; BALDWIN, C.L. 2006. Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. **Cellular Immunology**, **243(1)**:1-9.

SENGUPTA, D.; KOBLANSKY, A.; GAINES, J.; BROWN, T.; WEST, A.P.; ZHANG, D.; NISHIKAWA, T.; PARK, S.G.; ROOP, R.M.; GHOSH, S. 2010. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. **The Journal of Immunology**, **184(2)**:956-64.

SKAGGS, B.J.; SINGH, B.J.; HAHN, B.H. 2008. Induction of immune tolerance by activation of CD8+ T suppressor/regulatory cells in lupus-prone mice. **Human Immunology**, **69(11)**:790-6.

SKENDROS, P.; BOURA, P. 2013. Immunity to brucellosis. **Revue scientifique et technique**, **32(1)**:137-47.

SONG, S.; YUAN, P.; CHEN, J.; FU, J.; WU, H.; LU, J.T.; WEI, W. 2014. TGF- β favors bone marrow-derived dendritic cells to acquire tolerogenic properties. **Immunological Investigations**, **43(4)**: 360-369.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. 1997. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1355(2)**:131-40.

SOUZA, V.C.; SCHLEMMER, K.B.; NOAL, C.B.; JAQUES, J.A.; ZIMMERMANN, C.E.; LEAL, C.A.; FLECK, J.; CASALI, E.A.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.; LEAL, D.B. 2011. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. **Parasitology International**, **61(4)**:690-6.

TOBIAN, A.A.; POTTER, N.S.; RAMACHANDRA, L.; PAI, R.K.; CONVERY, M.; BOOM, W.H.; HARDING, C.V. 2003. Alternate Class I MHC Antigen Processing Is Inhibited by Toll-like Receptor Signaling Pathogen-Associated Molecular Patterns: Mycobacterium Tuberculosis 19-kDa Lipoprotein, CpG DNA, and Lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, **171 (3)**: 1413–22.

VELASCO, J.; BENGOCHEA, J. A.; BRANDENBURG, K.; LINDNER, B.; SEYDEL, U.; GONZALEZ, D.; ZÄHRINGER, U.; MORENO, E.; MORIYÓN, I. 2000. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative *Ochrobactrum* spp, differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, **68**: 3210–3218.

VIEIRA, N. R. 2004 **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella spp.* em amostras de sangue de cães naturalmente infectados.** Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIGNALI, D.A; COLLISON, L.W; WORMAN, C.J. 2008. How Regulatory T Cells Work. **Nature Reviews Immunology**, **8(7)**:523-32.

XAVIER, M. N. 2009. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos.** Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

YAN, B; LIU, Y. 2009. The Nature of Increased Circulating Cd4Cd25Foxp3 T Cells in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: A Novel Hypothesis. **Open Rheumatology Journal**, **9**: 22-24.

ZAITSEVA, M.; GOLDING, H.; MANISCHEWITZ, J.; WEBB, D.; GOLDING, B. 1996. *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. **Infection and Immunity**, **64(8)**:3109-17.

ZIMMERMANN, H. 2001. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. **Drug Development Research**, **52**: 44-56.

WEISS, D. S. et al. 2005. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, **73 (8)**: 5137–5143.