

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

Lívia Bittencourt dos Reis

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS
ENVOLVIDOS NA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA BACTÉRIA
*BRUCELLA ABORTUS***

JUIZ DE FORA

2015

LÍVIA BITTENCOURT DOS REIS

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS
ENVOLVIDOS NA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA BACTÉRIA
*BRUCELLA ABORTUS***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e DIP.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo

JUIZ DE FORA

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Reis, Livia Bittencourt .

Avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunomodulação induzida pela bactéria *Brucella abortus* / Livia Bittencourt Reis. -- 2015.

91 f. : il.

Orientador: Gilson Costa Macedo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. *Brucella abortus*. 2. Células regulatórias. 3. Imunomodulação. I. Macedo, Gilson Costa, orient. II. Título.

LÍVIA BITTENCOURT DOS REIS

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS
ENVOLVIDOS NA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA BACTÉRIA
*BRUCELLA ABORTUS***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo,
Universidade Federal de Juiz de Fora.

Profa. Dra. Alice Belleigoli Rezende,
Universidade Federal de Juiz de Fora.

Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes,
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho a Deus,
que a cada novo dia nos mostra
que há uma nova chance, novos
caminhos, novos rumos.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

A CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

Agradeço a Deus, que a cada nova manhã transmite-nos a força e a sabedoria que precisamos, que enche de luz nossa caminhada e que renova nossas esperanças a cada dia. A Nossa Senhora Aparecida, que me protege e me guarda em todos os momentos.

A minha irmã Lígia, que me proporciona os momentos mais felizes e os sorrisos mais sinceros. Que me apoia e me fornece o “chão” que eu preciso pra continuar. A ela minha eterna gratidão, pelo simples fato de existir na minha vida e torná-la mais bela. Amo-te, pra todo sempre.

Aos meus pais, Vera e Osvaldo, base da minha família, por todo carinho dedicado a mim e a minha irmã todo o tempo, pelos momentos vividos com alegria, por nos fazer felizes diante de tamanha simplicidade. A vocês meu agradecimento de coração, com um amor que transborda e que torna minha vida mais iluminada.

Ao Marcos, que torna meus dias mais coloridos e que me enche de alegria através de seu sorriso. Obrigada por ser um verdadeiro amor, por estar à frente de minhas inseguranças e meus medos, por me abraçar e me transmitir tranquilidade e paz. Por alegrar meus dias e meu coração com sua presença.

Ao meu orientador Gilson Costa Macedo, por me receber de portas abertas e me dar à oportunidade que eu precisava pra continuar. Por me fazer persistir na vida de bióloga e mostrar tamanha confiança em meu trabalho. Pela paciência, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo e pela amizade e cuidado dia a dia. Muito obrigada por tudo.

A minha amiga de laboratório e da vida, Danielle. Agradeço pela amizade, cumplicidade, por me ajudar em tudo que precisei, sem hesitar. Por torcer junto comigo por minhas possíveis conquistas e me incentivar a tentar novos caminhos. Por fazer nossa rotina virar diversão e tudo terminar em sorrisos.

As meninas do laboratório, Juliana, Thaynara, Bruna, Marcela e Letícia, por me acompanharem nos experimentos, me dar apoio e ficar ao meu lado. Pelas risadas compartilhadas, pela amizade e por tornar meus dias mais felizes.

Aos amigos e professores do laboratório de Imunologia, pelo convívio e exemplo diário. Em especial ao Luan e Ana, por sempre me ajudar nos momentos que precisei. Às professoras Ana Paula Ferreira, Sandra Bertelli e sua equipe, pelos ensinamentos desde a época da graduação e pelo grande apoio e atenção a mim prestados.

A minha tia Lourdinha e madrinha Terezinha, pelo amor desde criança, por me fornecerem o suporte necessário pra me tornar uma boa pessoa, com princípios e dedicação a todas as coisas que realizo em minha vida.

A minha prima Ellen, pelo grande papel de irmã, pelo carinho e amor sincero. Pelo incentivo, por me ajudar a resolver minhas incertezas e caminhar ao meu lado.

A toda minha família e amigos, pelo suporte e carinho.

Aos amigos de faculdade, por estarem presentes na minha vida, pela preocupação, por todos os momentos e alegrias compartilhados.

“O que verdadeiramente somos é aquilo que o impossível cria em nós.”

Clarice Lispecto

RESUMO

A *Brucella abortus* é uma bactéria Gram-negativa que apresenta forma de vida intracelular facultativa e é responsável por causar a brucelose, doença que afeta humanos e animais. A resposta imune contra este patógeno envolve vários mecanismos da imunidade inata e adquirida, entre os quais a citocina IFN- γ típica do perfil T_H1, bem como as células T CD8⁺, executam papéis importantes. Além das respostas imunitárias clássicas que são induzidas durante infecções por patógenos, as vias imunorregulatórias do hospedeiro podem também tornar-se ativadas no intuito de delimitar a amplitude e duração das respostas imunes, prevenindo a imunopatologia excessiva. Vários dados na literatura mostram o papel de algumas células e citocinas importantes no estabelecimento desta imunorregulação, tais como células T e B regulatórias e as citocinas IL-10 e TGF- β . Sobreviver a uma infecção requer, portanto, a geração de uma resposta imune controlada. Apesar da importância da imunorregulação, diversos patógenos tem exibido a capacidade de estimular os mecanismos de regulação como uma forma de se evadir do sistema imune e assim estabelecer sua infecção. Devido a isso a investigação do processo imunorregulador que surge em resposta a infecção ou que é induzida pelo próprio agente patogênico torna-se importante, podendo fornecer informações sobre novas abordagens terapêuticas para o controle da infecção. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na imunomodulação induzida pela bactéria *B. abortus* em modelo murino.

Como metodologia, animais C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* e sacrificados uma, três e seis semanas pós-infecção. Um grupo de animais não infectados foi utilizado como controle. Primeiramente, avaliamos a carga bacteriana presente no baço e o índice de proliferação celular de animais infectados ou não, pelo método de MTT e por citometria de fluxo. Analisamos também os níveis de citocinas (IFN- γ e IL-10) pelo método de ELISA e a produção de células T e B regulatórias por citometria de fluxo, em esplenócitos derivados desses animais. Por fim, avaliamos a influência da infecção com *B. abortus* no curso da Encefalomielite auto-imune experimental (EAE).

Como resultados, verificamos uma diminuição na proliferação celular em animais infectados, sendo esta mais proeminente em linfócitos TCD8⁺ e células NK⁺ (natural killer). Concomitantemente, foi percebido um aumento na produção da citocina IL-10. Além disso, animais infectados apresentaram maior número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ com perfil regulatório bem como células CD19⁺ produtoras de IL-10, principalmente na terceira semana pós-infecção. Em relação à EAE, de forma inesperada, foi percebido um aumento do escore clínico em animais infectados, comparados aos controles. Dessa forma, foi possível concluir que a infecção por *Brucella abortus* é capaz de induzir a presença de elementos imunorreguladores porém, estes elementos não foram suficientes para causar uma melhora no curso da EAE.

Palavras-chave: *Brucella abortus*, células regulatórias, imunomodulação.

ABSTRACT

Brucella abortus is a Gram-negative and facultative intracellular bacterium, responsible for brucellosis in humans and animals. The immune response against this pathogen involves different mechanisms from innate and acquired immunity, including IFN- γ , a typical cytokine from T_H1 profile, as well as CD8⁺ T-cells. Aside from the classic immune responses induced during an infection caused by a pathogen, the immunoregulatory pathways of the host can also be activated, limiting the range and the response time of immune responses, preventing an excessive immunopathology. Data from the literature shows the role of a range of cells and cytokines in establishing this immunoregulation such as T- and B-cell regulators and IL-10 and TGF- β cytokines. Survival to an infection process therefore requires the generation of a controlled immune response. Despite the importance of immunoregulation, a diversity of pathogens have shown the capacity to stimulate some regulation mechanisms to evade the immune system and then establish the infection. In this way, the investigation of the immunoregulation processes that occur in response to the infection or are induced by the pathogenic agent become important, as these can provide information about new therapeutic approaches for the control of infections. In this context, this study aimed to evaluate the immunological mechanisms involved in the immunomodulation induced by *B. abortus*, in a mouse model.

C57BL/6 animals were infected with *B. abortus* and sacrificed after one, three and six weeks of infection. Non-infected animals were used as a control group. Bacterial load was evaluated in the spleen and the cellular proliferation index was evaluated for infected and non-infected animals using the MTT method and flow cytometry. Cytokine levels (IFN- γ e IL-10) were evaluated through ELISA and regulatory profiles of T-cells and B-cells were assessed by flow cytometry in the splenocytes of these animals. The influence of *B. abortus* infection was also evaluated using an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model.

As results, a decrease in cellular proliferation was observed in infected animals, with a more prominent effect in TCD8⁺ lymphocytes and NK (natural killer) cells. An increase in IL-10 levels was concomitantly observed. Infected animals presented a higher number of T- cells (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺) and B-cells (CD19⁺IL-10⁺) with a regulatory profile, especially after the third week of infection. Regarding EAE, an unexpected increase in clinical score was observed in infected animals when compared to control group. Thus, we concluded that *Brucella abortus* infection is able to induce immunoregulatory elements, although it is insufficient to cause an improvement in EAE.

Key Words: *Brucella abortus*, regulatory cells, immunomodulation.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1** Possíveis mecanismos supressores das células T regulatórias. Da esquerda para a direita: 33
indução da expressão de B7H4 por células apresentadoras de antígenos, que por sua vez promovem uma parada no ciclo celular de células T; indução de morte direta de células-alvo, como APCs e células T, via liberação de perforinas e granzimas; indução da expressão da moléculaIDO, resultando na apoptose ou anergia das células T; liberação de IL-10 e TGF- β que inibem a ativação de células T e suprimem a função das APCs (Adaptado de ZOU, 2006).
- Figura 2** Mecanismos supressivos das células B regulatórias. As células Bregs podem agir: 35
suprimindo a ativação e diferenciação de células T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK; promovendo a disfunção de células apresentadoras de antígenos através da inibição das moléculas de MCH e/ou moléculas co-estimulatórias; através da liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β que induzem a presença de macrófagos supressivos e células T regulatórias e; através da eliminação de células em apoptose e redução dos auto-antígenos (Adaptado de MAURI; EHRENSTEIN, 2008).
- Figura 3** Potenciais estratégias usadas por patógenos para promover a indução e função de células 37
T regulatórias. Os microrganismos podem promover a indução de células Tregs para garantir sua própria sobrevivência dentro do hospedeiro. O dano tecidual induzido pelo processo patológico pode contribuir para aumentar a atividade de células Tregs nos locais de infecção, pela apresentação de antígenos próprios ou induzindo a liberação de citocinas que promovem a indução e sobrevivência de células Tregs. Outras estratégias podem envolver a indução da produção de citocinas, que promovem o recrutamento de células Tregs; a modulação de células apresentadoras de antígenos, interferindo na expressão de moléculas co-estimulatórias ou induzindo a liberação de citocinas que direcionam os linfócitos para um perfil regulatório; e também a liberação de PAMPs que induzem diretamente a ativação de células Tregs (Adaptado de BELKAID, 2007).
- Figura 4** **Curso da infecção por *B. abortus* em camundongos C57BL/6.** Animais foram infectados 51
intrapertonealmente com *B. abortus* S2308 (1x10⁶bactérias/animal) e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes no baço foi determinado nos diferentes intervalos de tempo após a infecção (n=5 por grupo).
- Figura 5** **Análise do índice de proliferação celular em animais infectados com *B. abortus*.** 52
Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal), (n=5 por grupo). Após uma, três e seis semanas de infecção (A, B e C, respectivamente), células do baço destes animais foram retiradas e cultivadas na presença ou não do estímulo Concanavalina A (5 μ g/mL). Após 72 horas de incubação o índice de proliferação celular foi avaliado pelo método de MTT. Como controles foram utilizados células provenientes de animais não infectados. O índice de proliferação foi calculado levando-se em conta a metabolização do MTT de células estimuladas e células não estimuladas. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. p<0,05.

- Figura 6** **Determinação da população de células CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e NK⁺ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*.** Dot-plots, figuras representativas de um experimento com 4 animais. (A) População de linfócitos. (B) População de células CD3⁺. (C) População de células CD4⁺ e CD8⁺. (D) População de células NK⁺. 53
- Figura 7** **Índice de proliferação celular de células CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e NK⁺ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*.** Animais C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal). Animais não infectados (NI) foram usados como controle (n=4 por grupo). Após uma, três ou seis semanas de infecção (1SPI, 3SPI e 6SPI, respectivamente) as células do baço foram extraídas, estimuladas ou não com ConA, lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 ou anti-NK1.1. (A) representação gráfica do índice de proliferação celular de células CD3⁺CD4⁺; (B) representação gráfica do índice de proliferação celular de células CD3⁺CD8⁺; (C) representação gráfica do índice de proliferação celular de células NK⁺. O índice de proliferação celular de cada animal foi determinado dividindo-se o número total de células obtido após estimulação com Concanavalina A pelo número total de células não estimuladas. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. p<0,05. 55
- Figura 8** **Produção de IFN-γ por esplenócitos de camundongos C57BL/6.** Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal), e um grupo de animais não infectados foram usados como controle (n=4 por grupo). Após uma, três e seis semanas de infecção (A, B e C, respectivamente), células do baço foram retiradas e cultivadas por 72 horas na presença dos estímulos *B. abortus* S2308 (10² bactérias/célula) e Concanavalina A (5μg/ml). A concentração da citocina foi determinada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. p<0,05. 57
- Figura 9** **Produção de IL-10 por esplenócitos de camundongos C57BL/6.** Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal), e um grupo de animais não infectados foram usados como controle (n=4 por grupo). Após uma, três e seis semanas de infecção (A, B e C respectivamente), células do baço foram retiradas e cultivadas por 48 horas na presença dos estímulos *B. abortus* S2308 (10² bactérias/célula) ou LPS (1μg/ml). A concentração da citocina foi determinada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. p<0,05. 59
- Figura 10** **Determinação da população de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*.** Dot-plots, figuras representativas de um experimento com 4 animais. (A) População de linfócitos. (B) População de células CD4⁺ e CD8⁺. (C) População de células CD25⁺. (D) População de células FoxP3⁺. 60
- Figura 11** **Percentual e número de células regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ no baço de animais infectados com *B. abortus*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal), e, após uma, três e seis semanas de infecção (1SPI, 3SPI e 6SPI respectivamente) foram sacrificados para extração de células do baço. Um grupo de animais não infectados foi usado como controle (n=4 por grupo). Estas células foram então lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-FoxP3 ou, anti-CD8, anti-CD25 e anti-FoxP3. (A e B) representação gráfica do percentual e número de 62

células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. (C e D) representação gráfica do percentual e número de células CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺. Os valores referentes ao número de células foram obtidos multiplicando-se o valor do percentual encontrado pelo número de células do baço de cada tipo. Os percentuais de células FoxP3⁺ são referentes ao percentual desta população encontrado dentro da população de células CD25⁺, sendo o valor desta última população referente ao seu percentual dentro da população de células CD4⁺ ou CD8⁺ (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. *p*<0,05.

- Figura 12** **Determinação da população de células CD19⁺IL-10⁺ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*.** Dot-plots, figuras representativas de um experimento com 4 animais. (A) População de linfócitos. (B) População de células CD19⁺. (C) População de células produtoras de IL-10. 63
- Figura 13** **Percentual e número de células CD19⁺ produtoras de IL-10 no baço de animais infectados com *B. abortus*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal), e, após uma, três e seis semanas de infecção (1SPI, 3SPI e 6SPI respectivamente) foram sacrificados para extração de células do baço. Um grupo de animais não infectados foi usado como controle (n=4 por grupo). Estas células foram então lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD19 e anti-IL-10 (A) representação gráfica do percentual de células CD19⁺ produtoras de IL-10 (B) representação gráfica do número de células CD19⁺ produtoras de IL-10. Os valores referentes ao número de células foram obtidos multiplicando-se o valor do percentual encontrado pelo número de células do baço de cada tipo. Os percentuais de IL-10 são referentes ao percentual desta população encontrado dentro da população de células CD19⁺ (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. *p*<0,05. 64
- Figura 14** **Média do escore clínico em animais submetidos ao protocolo de EAE.** Escore clínico dos camundongos imunizados com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 por grupo). Os sinais clínicos foram registrados do dia 0 ao dia 25 após a imunização. A infecção com *B.abortus* e o tratamento com HKBa tiveram início no 12º dia após a imunização. EAE= grupo imunizado, não tratado/infectado; EAE/Ba = grupo imunizado e infectado com *Brucella abortus*; EAE/HKBa = grupo imunizado e tratado com HKBa. * Significativo em relação ao grupo EAE, por ANOVA seguido de teste de Bonferroni post hoc. *p*<0,05. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos animais em grupos de acordo com a indução e tratamento/infecção.	48
Tabela 2	Escala neurológica clínica para avaliar a EAE.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	“Ammonium-Chloride-Potássium” - Cloreto de amônio e potássio
APC	Células apresentadoras de antígenos
BB	“ <i>Brucella Broth</i> ” - Meio <i>Brucella</i>
Bregs	Células B regulatórias
CTLA-4	“Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4” - Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
FMO	“Fluorescende Minus One” - Fluorescentes menos um
FoxP3	Fator de transcrição <i>Forkhead</i> box P3
HKBa	“Heat-Killed <i>Brucella abortus</i> ” - <i>Brucella abortus</i> morta pelo calor
IDO	“Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase” - Indoleamina-pirrole 2,3-dioxigenase
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina

KO	“Knockout” - Nocaute
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	“Major histocompatibility complex” - Complexo de histocompatibilidade principal
MOG	Glicoproteína associada ao oligodendrócito
MTT	Corante <i>thiazol blue tetrazolium bromido</i>
NF-κB	“Nuclear fator kappa B” - Fator nuclear Kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	“Non Obese Diabetic” – Diabéticos não obesos
PAMP	“Pathogen-associated molecular pattern” - Padrão molecular associado a patógenos
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNCBT	Programa nacional de controle da Brucelose e Tuberculose animal
PRR	“Pattern recognition receptor” – receptor de reconhecimento de padrões
TGF-β	“Transforming growth fator- beta” - Fator-beta de transformação do crescimento

T_H1	“T helper 1” – Linfócito T auxiliar 1
T_H17	“T helper 17” – Linfócito T auxiliar 17
T_H2	“T helper 2” – Linfócito T auxiliar 2
TLR	“Toll-like receptor” – Receptor do tipo Toll
TNF-α	“Tumor necrosis fator alpha” - Fator- <i>alfa</i> de Necrose Tumoral
Tregs	Células T Regulatórias
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Epidemiologia.....	22
1.2 Patogênese	24
1.3 Resposta imune	25
1.4 Imunorregulação	28
1.4.1 Células regulatórias	30
1.4.2 Imunomodulação e patógenos.....	35
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Delineamento experimental	41
3.2 Animais	41
3.3 Cepas bacterianas	41
3.4 Condições de cultivo bacteriano	41
3.5 Inativação das bactérias pelo calor	42
3.6 Infecção	42
3.7 Carga bacteriana.....	42
3.8 Cultura de esplenócitos.....	42
3.9 Dosagem de citocinas.....	43
3.10 Índice de proliferação (MTT - Corante <i>thiazol blue tetrazolium bromido</i>).....	43
3.11 Análise do índice de proliferação celular por citometria de fluxo	44
3.12 Análise do perfil de células T regulatórias por citometria de fluxo.....	45
3.13 Análise do perfil de células B regulatórias por citometria de fluxo	46
3.14 Indução do Modelo de EAE	48
3.15 Eutanásia e coleta de tecidos e órgãos dos animais (Experimento com EAE)	49
3.16 Análises estatísticas.....	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Avaliação da carga bacteriana	51
4.2 Avaliação da proliferação celular	51
4.3 Avaliação da produção de citocinas por esplenócitos estimulados com <i>B.abortus</i>	55

4.4 Avaliação do percentual de células regulatórias em animais infectados com <i>B.abortus</i>	59
4.5. Influência da imunossupressão induzida pela <i>B. abortus</i> no curso da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)	64
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO.....	75
7 PERSPECTIVAS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Brucella* sp são cocobacilos Gram-negativos não encapsulados, sem capacidade de locomoção e de formar esporos (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003). Estes microrganismos apresentam forma de vida intracelular facultativa e são os responsáveis por causar a brucelose, doença que atinge humanos e vários tipos de animais (YOUNG, 1983).

Existem 10 espécies de *Brucella* sp classificadas com base na especificidade de seu hospedeiro: *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 as infecções causadas por *B. canis* raras em humanos (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).

As bactérias do gênero *Brucella* sp podem apresentar dose infecciosa até mesmo em baixas quantidades e são facilmente aerossolizadas, ou seja, são facilmente dispersas no ar, podendo ser transmitidas por meio deste. Além disso, infecções humanas com estas bactérias são debilitantes e difíceis de tratar (FRANZ et al., 1997; PAPPAS; PAPADIMITRIOU, 2007). Em função dessas características, estas bactérias encontram-se na lista dos agentes etiológicos de preocupação com relação ao seu potencial uso em bioterrorismo (GREENFIELD et al., 2002; PAPPAS et al., 2006^b).

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

Além de poder, eventualmente, infectar o homem, havendo assim uma preocupação com a saúde pública, as infecções por *Brucella* em animais têm um importante impacto econômico, especialmente nos países em desenvolvimento, pois

além de causar a infertilidade e o aborto nas fêmeas gestantes, reduzem também a produção de leite (BRIONES et al., 2001). Somado a isso, a doença é ainda considerada uma causa importante de morbidade e mortalidade veterinária, gerando perdas econômicas ainda mais significativas (FRANCO et al., 2007). Em regiões com alta prevalência da doença, a única maneira de controlar e erradicar esta zoonose é através da vacinação de todos os animais susceptíveis e eliminação de animais infectados (BRIONES et al., 2001).

Em seres humanos, a infecção com *Brucella* sp ocorre através do contato direto com animais ou materiais infectados ou culturas de laboratório. Em regiões endêmicas, a via de infecção mais comum é o consumo de produtos lácteos não pasteurizados, principalmente o leite e o queijo produzido com leite não pasteurizado (JONG; ROLAN; TSOLIS, 2010; EKICI et al., 2012; AVILA-CALDERON et al., 2013).

Como já citado, há três espécies de *Brucella* que merecem atenção devido aos riscos de infecção em humanos: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*. Embora cada uma delas possuam diferentes reservatórios zoonóticos, a nível genômico e com relação ao seu comportamento em modelos de infecção, as três espécies compartilham muitas semelhanças, tanto com relação à forma de infecção quanto em relação aos sintomas e patogênese (DELVECCHIO et al., 2002.; PAULSEN et al., 2002). Os sintomas incluem febre ondulante, arrepios, mal-estar, astenia, endocardite, artrite, encefalite e até complicações neurológicas (FRANCO et al., 2007; HE, 2012).

Tem sido relatado que formas agudas e crônicas da brucelose podem afetar a coluna vertebral (PAPPAS et al., 2005). Esta derivação da doença, conhecida como brucelose espinhal, normalmente afeta os idosos. A brucelose também pode levar a inflamação das articulações, causando a artrite, geralmente registrada nos pacientes com até 30 anos (ALP; DOGANAY, 2008).

Um estudo de Ekici e colaboradores (2012) relataram a ocorrência de osteomielite em indivíduos com brucelose, que geralmente ocorre nas vértebras, principalmente na região lombossacral. O comprometimento do espaço epidural é raro, mas a formação de abscessos epidurais espinhais já foi relatada em menos de 1,5% dos casos com complicações neurológicas e geralmente associadas com espondilite. A frequência de comprometimento medular geralmente é visto na coluna lombar, torácica e cervical.

A brucelose em seres humanos raramente é fatal, mas pode levar a debilidade severa e incapacidade. Relata-se que cerca de 2% dos pacientes não tratados morrem de brucelose. A doença tem tendência para a cronicidade e persistência, podendo se tornar uma doença granulomatosa capaz de afetar qualquer órgão (CHRISTOPHER; UMAPATHY; RAVIKUMAR, 2010).

O diagnóstico rápido e preciso da brucelose humana continua a desafiar os médicos devido a suas características clínicas não específicas, sendo frequentemente confundida com a gripe em função de seus sintomas iniciais semelhantes (MEMISH et al., 2000). O isolamento do microrganismo é o teste padrão para confirmar a infecção, no entanto, esse processo consome tempo e requer técnicos qualificados. Além disso, o manuseamento das amostras contendo o patógeno representa um alto risco de contaminação. A brucelose é a doença bacteriana mais comum de ser adquirida em laboratório no mundo (LUNA-MARTÍNEZ; MEJÍA-TERÁN, 2002; PAPPAS et al., 2006^a).

Segundo o programa nacional de controle da Brucelose e Tuberculose animal (PNCBT) os métodos diretos de diagnóstico utilizados no Brasil são o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica, e métodos de detecção de ácidos nucleicos (PCR – Reação em cadeia da polimerase). Já os métodos indiretos consistem primariamente na detecção de imunoglobulinas nos fluidos corporais como soro, leite, muco vaginal e sêmem (BRASIL, 2006).

Em relação ao tratamento, 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. Os antimicrobianos mais utilizados são as tetraciclínas, os aminoglicosídeos, a rifampicina, o cotrimoxazol, as quinolonas e as cefalosporinas de 3^a geração. A escolha da associação de antibióticos está em dependência direta de vários fatores, dentre eles a idade, gravidez, toxicidade potencial e gravidade do quadro clínico (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003; ARIZA et al., 2007; FANNI et al., 2013). Apesar do tratamento poder levar a cura, em função da localização intracelular da *Brucella* sp e a sua capacidade de se adaptar as condições ambientais encontradas em seu nicho replicativo, há uma alta incidência de falha do tratamento e de recidivas da patologia (PAPPAS et al., 2006^a).

1.1 Epidemiologia

A brucelose permanece sendo a zoonose bacteriana mais comum do mundo, sendo endêmica em muitas regiões, inclusive na América Latina, oriente médio, África, Ásia e na bacia do mediterrâneo. Cerca de meio milhão de novos casos de brucelose humana são registrados anualmente no mundo (MANTUR; AMARNATH, 2008; HE, 2012; AVILA-CALDERON et al., 2013). Em determinados países, a taxa de prevalência pode ultrapassar 10 casos por 100.000 habitantes, sendo ainda mais elevada em pessoas que trabalham em fazendas (MANTUR; AMARNATH, 2008).

O controle dos patógenos que causam a brucelose e dos reservatórios animais através da vacinação e remoção de agentes é um fator que contribui 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).

Em 2008, 12 países da União Europeia foram declarados oficialmente livres da brucelose e quinze países que ainda não haviam sido declarados livres relataram casos de brucelose em bovinos. No sul da Europa, a situação é menos favorável, no entanto, a presença da doença permanece em níveis baixos, sendo inferior a 1%. Nos Estados Unidos quase todos os estados são classificados como livres de *B. abortus* em bovinos. No entanto, a infecção persiste em animais selvagens em algumas áreas do país. De 2007 até 2013 já foram detectados rebanhos bovinos infectados com brucelose em Montana, Wyoming e Idaho, sendo a fonte de infecção o veado norte-americano (*Cervus elaphus*), mostrando que a doença pode apresentar uma reemergência, principalmente na presença de reservatórios animais (APARICIO, 2013). A infecção por *Brucella* sp em um rebanho se deve principalmente a introdução de animais infectados, um fator que favorece a sua reemergência em locais já livres de brucelose (APARICIO, 2013).

No Brasil, a brucelose foi detectada pela primeira vez em 1913 por Gonçalves Carneiro, que relatou um caso de brucelose humana. Desde então, diversos estudos epidemiológicos tem revelado a presença da doença na população e no rebanho bovino em todo o país. A brucelose bovina, desencadeada pela *Brucella abortus* é a infecção por *Brucella* sp mais prevalente no Brasil, seguido por *B. suis* em suínos. *B. melitensis* e *B. neotomae* nunca foram isolados no país (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002).

O Brasil tem a maior população de gado comercial do mundo. Estudos anteriores revelaram que a brucelose bovina foi difundida em todo país, com prevalência de 4,1% na região norte; 2,5% na região noroeste; 6,8% na região oeste; 7,5% na região sudeste; e 4% na região sul do país (BRASIL, 1997). O estado do Rio Grande do Sul, como resultado de um programa de vacinação bem sucedida, teve sua prevalência diminuída de 2,0% em 1977 para 0,3% em 1986. Em Santa Catarina, houve um aumento de 0,2% em 1977 para 0,6% em 1996. No Mato Grosso do Sul, a prevalência era estável entre 1977 e 1998, a uma taxa de 6,3%. Em Minas Gerais, o maior estado de laticínios no Brasil, a prevalência caiu de 7,6% em 1977 para 6,7% em 1980 (CASTRO, 1982). Assim, a prevalência da brucelose bovina no Brasil variou de 4 a 5% no período de 1989 a 1998. As principais pesquisas de prevalência ainda estão em curso no momento na maioria dos estados brasileiros. Os dados mostram uma situação endêmica bastante estável e uma maior prevalência da doença nas regiões de densidade mais elevadas de gado (POESTER, GONÇALVES, LAGE, 2002).

Foi realizado recentemente um levantamento epidemiológico dos estados brasileiros a partir de um estudo amostral de propriedades rurais, para obtenção da prevalência da brucelose bovina. As coletas foram realizadas entre os anos de 2001 e 2004. Os dados já analisados até agora, indicam que a prevalência de focos da doença nessas propriedades amostradas foi de 4,2% na Bahia; 2,5% no Distrito Federal; 9% no Espírito Santo; 17,54% em Goiás; 6,04% em Minas Gerais; 4,02% no Paraná; 15,42% no Rio de Janeiro; 35,18% em Rondônia; 0,32% em Santa Catarina; 12,60% em Sergipe; 9,70% em São Paulo; e 21,22% em Tocantins (ALVES; VILLAR, 2011).

Poucas pesquisas de brucelose suína têm sido realizadas no Brasil, e as perdas econômicas devido à doença não são determinadas com precisão. Uma pesquisa nacional realizada em 1981 revelou uma prevalência de 2,19% da doença (GARCIA-CARRILLO, 1987). O último relatório da brucelose suína no Brasil indicou uma prevalência de 0,34% (BRASIL, 2000). Provavelmente essa queda está relacionada ao controle da brucelose em locais com criação de suínos para fins comerciais, uma vez que este é muito rigoroso e realizado sob supervisão constante (POESTER, GONÇALVES, LAGE, 2002).

Em decorrência da disseminação da brucelose bovina no Brasil, observa-se uma perda econômica significativa deste rebanho, bem como dos produtos de

origem animal, como carne, leite e derivados, tornando os mesmos vulneráveis às barreiras sanitárias no mercado internacional, gerando também um grande prejuízo para economia do país (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002).

1.2 Patogênese

Nos seres humanos, as espécies patogênicas de *Brucella* sp causam uma doença febril conhecida como brucelose. A característica patogênica chave deste grupo de organismos é a sua capacidade para sobreviver em células hospedeiras e persistir em tecidos do sistema mononuclear fagocitário (JONG; ROLAN; TSOLIS, 2010), sendo capaz de sobreviver e se replicar predominantemente em macrófagos (ROOP et al., 2004).

Após sua entrada em humanos ou animais, as bactérias invadem a circulação sanguínea e os vasos linfáticos, onde se multiplicam dentro de células fagocíticas e eventualmente podem causar septicemia (HE, 2012). Posteriormente, as bactérias acumuladas são disseminadas para outras células hospedeiras. Uma vez que as bactérias passam pelas superfícies mucosas, estas podem disseminar-se rapidamente para tecidos do sistema mononuclear fagocitário incluindo fígado, baço e linfonodos. Se a doença inicial não for diagnosticada ou tratada adequadamente, a bactéria pode persistir nesse sistema, bem como em outros tecidos tais como articulações, levando a artrite e outras complicações osteoarticulares. Nas espécies hospedeiras zoonóticas, a *Brucella* sp pode infectar o trato reprodutivo, onde então pode causar aborto ou esterilidade (JONG; ROLAN; TSOLIS, 2010).

A patogênese causada pela infecção com a *Brucella* sp está intimamente associada ao seu modo de vida intracelular. No interior das células, este patógeno é capaz de evitar mecanismos extracelulares de defesa do hospedeiro, como anticorpos e complemento, e assim estabelecer a infecção (SANGARI; AGUERO, 1996). Uma vez no ambiente intracelular a *Brucella* sp é capaz de manter uma infecção crônica, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico e o tratamento (AVILA-CALDERON et al., 2013). Para isso, estes patógenos são capazes de alterar ou se adaptar ao ambiente da célula através de um mecanismo conhecido como sistema de secreção do tipo IV. Este sistema permite a bactéria liberar fatores de virulência tanto para o meio externo quanto para dentro da célula hospedeira, modulando o ambiente e favorecendo sua sobrevivência e multiplicação intracelular (CHRISTOPHER; UMAPATHY; RAVIKUMAR, 2010). Além disso, esse sistema de

secreção também ajuda na aderência e entrada da bactéria na célula hospedeira (MARIA et al., 2007)

O ciclo de vida da *Brucella* sp contém basicamente duas fases: a infecção crônica de macrófagos, levando a sobrevivência e multiplicação da bactéria, e a infecção aguda de células fagocíticas não-epiteliais, causando uma patologia do aparelho genital e aborto. O baço e o fígado são os órgãos que mais apresentam células bacterianas após a invasão por *Brucella* sp (HORT et al., 2003).

1.3 Resposta imune

A primeira linha de mecanismos de defesa contra a *Brucella* sp se inicia com o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (KAWAI; AKIRA, 2007). Esta detecção é realizada principalmente pelos receptores do tipo Toll (TLRs) e representa um passo crítico na ativação da resposta imune inata, sendo essencial para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (O'NEILL, 2006; WEST; KOBLANSKY; GHOSH, 2006). Os TLRs se localizam na membrana plasmática ou em membranas endocíticas e permitem ao hospedeiro distinguir as bactérias dos agentes virais e parasitários através do reconhecimento dos PAMPs (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; HOEBE; JANSSEN; BEUTLER, 2004).

Com relação aos TLRs envolvidos no reconhecimento da *Brucella* sp, já é conhecido que o TLR2 e TLR4 participam dessa sinalização, induzindo a produção de diferentes citocinas (OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, TLR9 parece ser o receptor que desempenha um papel mais relevante na eliminação da bactéria (MACEDO et al., 2008). Foi demonstrado que o DNA (ácido desoxirribonucleico) da *Brucella* sp apresenta ligantes para TLR9 e que a resposta de citocinas do tipo T *helper* 1 (T_H1) é dependente da ativação de TLR9 (HUANG et al., 2005). Além disso, Macedo e colaboradores (2008) demonstraram uma redução parcial na produção de interleucina (IL)-12 em macrófagos e células dendríticas oriundas de animais deficientes de TLR9 (TLR9 KO - Knockout) bem como um aumento no número de bactérias presentes no baço, demonstrando a grande importância deste receptor. Já a produção de TNF- α (Fator-alfa de Necrose Tumoral) e NO (óxido nítrico) não foram afetadas pela ausência do receptor TLR9 (HUANG *et al.*, 2005; MACEDO *et al.*, 2008). Outros estudos utilizando modelo de infecção por *B. melitensis*, sugerem

ainda que o receptor TLR4 coopera com TLR9 na detecção destas bactérias e no estabelecimento de uma resposta efetiva (COPIN et al., 2007). Além dos receptores já citados, um estudo mais recente, realizado por Almeida e colaboradores (2013) demonstrou que o TLR6 também é um importante componente envolvido no desencadeamento de uma resposta imune e indução de resistência contra a infecção. Os resultados deste estudo mostraram que componentes do patógeno são reconhecidos pelo TLR6 em células dendríticas derivadas da medula óssea, induzindo a produção de IL-12 e TNF- α por essas células (ALMEIDA et al., 2013).

Os macrófagos desempenham um importante papel na resposta imune contra a brucelose, já que as bactérias se multiplicam e sobrevivem dentro dos mesmos. Uma vez ativados, os macrófagos realizam a fagocitose e a destruição do microrganismo principalmente pela indução de superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (BALDWIN; GOENKA, 2006). Além disso, produzem citocinas como a IL-12, que induz respostas do tipo T_H1 com consequente produção de IFN- γ (Interferon-gama), e este, por sua vez, ativa mais macrófagos, ajudando no combate à infecção (OLIVEIRA et al., 1998; MURPHY et al., 2001).

As células dendríticas também estão envolvidas na imunidade contra *Brucella* sp principalmente através do processo de apresentação de antígenos e produção de IL-12 que, como já mencionado, estimula a diferenciação para o perfil T_H1. Além disso, a IL-12 liberada pelas células dendríticas e macrófagos é capaz de estimular as células *Natural Killer* (NK) a produzirem IFN- γ , o que potencializa ainda mais a resposta T_H1 e a ação dos macrófagos (BIRON, 1999; HUANG et al., 2001).

A citocina TNF- α oriunda de macrófagos ou de células T_H1 também desempenha um papel relevante na eliminação da bactéria. Esta molécula aumenta a atividade bactericida dos fagócitos, além de estar envolvida nos processos patológicos (GOLDING et al., 2001; YINGST et al., 2003; BALDWIN; GOENKA, 2006).

Na resposta imune adquirida contra *Brucella* sp, a citocina IL-12 secretada principalmente por células dendríticas e macrófagos parece executar um papel crucial. Esta molécula atua na ativação de células T CD4⁺ promovendo sua diferenciação para o perfil T_H1, que produz IFN- γ e TNF- α (SPLITTER et al., 1996; HE et al., 2001). O IFN- γ , além de ativar as funções microbicidas dos macrófagos, também estimula a apresentação de antígenos através das moléculas de MHC

(Complexo de histocompatibilidade principal) de classe I e II (BOEHM, 1997) e induz a troca de isótipo de imunoglobulina (IgG) para IgG2a, o que favorece a fagocitose do microrganismo, aumentando assim a proteção contra o patógeno (GOLDING et al., 2001).

Os linfócitos T CD8⁺ também são importantes constituintes da resposta contra a *Brucella* sp. Estas células além de contribuírem com a produção de IFN- γ e TNF- α , também possuem função citotóxica, reconhecendo e eliminando as células-alvo infectadas, através da liberação de perforinas e granzimas (OLIVEIRA; SPLITTER, 1995; HE et al., 2001). A resposta dessas células se mostrou essencial para a eliminação da infecção, uma vez que na ausência da molécula de MHC de classe I, na qual os linfócitos TCD8⁺ se ligam para efetuar sua ação efetora, há uma exacerbação da brucelose murina, o que não é visto na ausência do MHC classe II, ligante das células T CD4⁺. Esses dados evidenciam a importância das células T CD8⁺ na imunidade mediada por células no controle da brucelose experimental (OLIVEIRA; SPLITTER, 1995).

Como descrito, o principal mecanismo responsável pela proteção contra a *Brucella* sp é a liberação de IFN- γ e o aumento da atividade antimicrobiana dos macrófagos (OLIVEIRA et al., 1998). O papel crucial de IFN- γ na resistência à brucelose já foi demonstrado e confirmado em vários estudos onde foram usados camundongos knockout para IFN- γ . Murphy e colaboradores (2001) demonstrou que animais deficientes de IFN- γ apresentam um aumento de cerca de 100 vezes no número de bactérias recuperadas do baço, seis semanas e meia após a infecção com *Brucella* sp, quando então sucumbem à infecção. Corroborando com esses dados, um estudo mais recente, de Brandão e colaboradores (2011), mostrou também que camundongos KO para IFN- γ apresentam significativamente mais bactérias no baço na primeira semana pós-infecção, sucumbindo à infecção no 16º dia, enquanto camundongos selvagens C57BL/6 continuaram vivos, mesmo após 50 dias da infecção, tempo em que o trabalho foi analisado. Em ambos os estudos, observamos que a falta de IFN- γ ocasiona a morte desses animais, porém em tempos bem diferentes, o que provavelmente está relacionado com a carga bacteriana utilizada na infecção, uma vez que no primeiro estudo esta foi de 5×10^3 UFC e no segundo, de 1×10^6 UFC, ambos utilizando a cepa virulenta de *B.abortus* S2308 (MURPHY et al., 2001; BRANDÃO et al., 2001). Esses resultados reforçam

os dados de que o IFN- γ é um componente crítico no combate a brucelose e que o controle dessa zoonose é dependente dessa citocina (BRANDÃO et al., 2011).

Além da imunidade celular, a imunidade humoral também pode contribuir para a proteção contra a brucelose, embora de maneira pouco efetiva. Durante as primeiras horas de infecção, os anticorpos são capazes de realizar a opsonização dos microrganismos e assim facilitar a ocorrência da fagocitose. Entretanto, a habilidade do patógeno de sobreviver e replicar no interior das células torna-o inacessível aos mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS; HO, 1983).

1.4 Imunorregulação

Além das respostas imunitárias clássicas que são induzidas durante infecções por patógenos, as vias imunorregulatórias do hospedeiro podem também tornar-se ativadas para limitar a amplitude e duração das respostas imunes e para prevenir a imunopatologia excessiva (HORIKAWA et al., 2013).

Vários dados na literatura apontam para o papel de algumas células e moléculas importantes no estabelecimento da imunorregulação do sistema imune, tais como as citocinas IL-10 e TGF- β (Fator-beta de transformação do crescimento) e as células T e B regulatórias (GAZZINELLI et al., 1992; REDPATH; GHAZAL; GASCOIGNE, 2001; GORELIK; FLAVELL, 2002; MIZOGUCHI; BHAN, 2006; SCOTT-BROWNE et al., 2007; SHAFIANI et al., 2010).

Inicialmente, a citocina IL-10 foi identificada como um “fator de inibição da síntese de citocinas”, um produto da resposta de linfócitos T *helper* 2 (T_H2), capaz de bloquear a produção de citocinas T_H1 (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989). Além disso, a IL-10 também seria capaz de inibir outras células, como macrófagos e células dendríticas, impedindo a ativação da resposta T_H1 (MOORE et al., 2001). Atualmente já se sabe que a IL-10 não é produto apenas de células T_H2 , mas também pode ser produzida pela maioria das células, senão todos os subconjuntos de células T $CD4^+$, incluindo células de perfis T_H1 e T_H17 (T *helper* 17), células B, macrófagos, neutrófilos e alguns subconjuntos de células dendríticas (SARAIVA; O’GARRA, 2010).

Um importante estudo que demonstra a ação da IL-10 em controlar respostas inflamatórias foi realizado por Sellon e colaboradores (1998). Utilizando animais

deficientes para IL-10, estes autores demonstraram que a ausência desta citocina está associada ao surgimento espontâneo de inflamação intestinal em conjunto com uma desregulação na produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-12, confirmando o papel essencial desta molécula no controle da resposta imune patológica.

Apesar de sua importante ação em evitar respostas exacerbadas, a IL-10 também pode inibir a resposta imune protetora contra agentes patogênicos através do bloqueio da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e a IL-12, agindo diretamente sobre as células apresentadoras de antígenos, tais como os macrófagos e células dendríticas (FIORENTINO et al., 1991^a; FIORENTINO et al., 1991^b). A IL-10 também pode inibir a fagocitose e a morte de microorganismos limitando a produção de espécies reativas de oxigênio, mecanismos fundamentais para mediar à imunidade a patógenos intracelulares (GAZZINELLI et al., 1992; REDPATH; GHAZAL; GASCOIGNE, 2001). Esta ação desfavorável da IL-10 tem sido evidenciada em diversos estudos com doenças infecciosas utilizando os patógenos *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* e *Brucella abortus*. Nestes trabalhos foi relatado um aumento na eliminação de patógenos na ausência da citocina IL-10 o que demonstra que a produção desta citocina pode, em determinados casos, beneficiar o patógeno (WAGNER et al., 1994; DAI; KOHLER ; BROMBACHER ,1997; BELKAID et al., 2001; MURRAY et al., 2002; CORSETTI et al., 2013).

Uma importante fonte da citocina IL-10 são as células T regulatórias (Tregs). Essas células possuem grande relevância para o estabelecimento da imunorregulação e podem suprimir respostas efetoras através da liberação de citocinas como TGF- β e IL-10, bem como através de mecanismos de contato, via molécula CTLA-4 (Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico) (ZOU, 2006; BARNES; POWRIE, 2009; SARAIVA; O' GARRA, 2010).

Um estudo utilizando o modelo animal da esclerose múltipla (Encefalomielite autoimune experimental - EAE) mostrou um aumento na diferenciação de células Tregs na presença da citocina IL-10, o que induz ainda mais a produção de IL-10 durante a doença (BARRAT et al., 2002). Além disso, essa citocina se mostrou necessária para manter a expressão de FoxP3 (fator de transcrição *forkhead box P3*), característica de células Tregs e a função destas células (MURAI et al., 2009). Esses dados propõem um feedback positivo para a indução de IL-10 por populações

de células Tregs, e evidenciam um papel importante das células Tregs e da citocina IL-10 na regulação da resposta imune.

Outra citocina que exerce grande importância na regulação da resposta imune, principalmente de células T, e na indução da tolerância imunológica é o TGF- β (GORELIK; FLAVELL, 2002). O papel crucial do TGF- β na regulação foi sugerido pela descoberta dos efeitos anti-proliferativos dessa citocina sobre as células T *in vitro*. Sua ação inibitória sobre a proliferação foi largamente atribuído à inibição da produção de IL-2, uma citocina essencial para a proliferação de células T (BRABLETZ et al., 1993).

Foi demonstrado também que o TGF- β é uma importante citocina que auxilia na diferenciação de células T CD4⁺ naive em células T regulatórias (CHEN et al., 2003; YAMAGIWA et al., 2001), além de inibir substancialmente a função das células apresentadoras de antígenos (BONECINI-ALMEIDA et al., 2004).

Em concordância, estudos recentes realizados por Song e colaboradores (2014) demonstraram que o TGF- β 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 (considerado um importante marcador de células dendríticas tolerogênicas) eIDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase). O tratamento com TGF- β também aumentou a produção de IL-10 e diminuiu a produção de IL-12. Estes estudos demonstram claramente o envolvimento do TGF- β na indução da imunorregulação.

Além da participação das citocinas IL-10 e TGF- β e das células Tregs na imunorregulação, outra célula que exerce grande papel nesse processo são as células B regulatórias (Bregs). A função reguladora das células Bregs parece estar diretamente relacionada com a produção das citocinas IL-10 e TGF- β e/ou pela capacidade das células B em interagir com células T patogênicas, diminuindo as respostas imunes prejudiciais (MIZOGUCHI; BHAN, 2006). Os tipos e funções das células regulatórias serão discutidos a seguir.

1.4.1 Células regulatórias

Estudos diversos têm sido direcionados para o melhor entendimento da função de células regulatórias nas mais variadas patologias. Em função de seu potencial, o desenvolvimento ou indução de células regulatórias tem se mostrado um

mecanismo promissor, uma vez que permite uma modelação favorável da resposta imune (BELKAID, 2007; FEUERER et al., 2009).

1.4.1.1 Células T regulatórias

Em todos os sistemas biológicos há o envolvimento de um feedback negativo no intuito de limitar as respostas imunes e assim diminuir a imunopatologia. Já se sabe que as células T regulatórias desempenham papéis fundamentais nestes processos, contribuindo para a manutenção da homeostase do sistema imune (FEUERER et al., 2009).

As células Tregs são definidas principalmente pela expressão dos marcadores CD4 ou CD8, CD25 e do fator de transcrição FoxP3 (BUCKNER, 2010). Essa população de células T é especializada na supressão de respostas imunes, o que já tem sido postulado desde os anos de 1970 (GERSHON, 1975). Portanto, exercem importante função na manutenção da tolerância imunológica e prevenção de doenças inflamatórias (CAMPBELL; KOCH, 2011). Estudos com camundongos mostram que a ausência ou depleção de células Tregs e também deficiências no fator de transcrição FoxP3 fundamentam a linfoproliferação e a autoimunidade em diversos órgãos (FEUERER et al., 2009; BUCKNER, 2010).

Estudos utilizando modelos experimentais de doenças auto-imunes tem sugerido que as células T regulatórias são capazes de controlar em parte a autoimunidade (MALOY; POWRIE, 2001). Em modelos murinos de colite, por exemplo, a transferência de células Tregs foi suficiente para controlar o estabelecimento da doença inflamatória (MOTTET; UHLIG; POWRIE, 2003).

A alteração da função e/ou homeostase de células Tregs tem sido implicada no desenvolvimento de doenças autoimunes com características inflamatórias, incluindo diabetes tipo 1, artrite reumatóide, esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, as células Tregs também mostraram ações na regulação da imunidade a infecções de origens virais, bacterianas ou parasitárias, e podem também conter respostas imunes dirigidas para tumores ou transplantes. Desta forma, estas células são importantes no estabelecimento de uma imunidade não patológica, impedindo doenças inflamatórias e restringindo respostas aberrantes contra antígenos próprios ou contra outros antígenos (CAMPBELL; KOCH, 2011).

Tem sido observado que algumas citocinas e moléculas envolvidas nas cascatas de sinalização intracelular podem contribuir para o desenvolvimento de células Tregs. A exposição a IL-2 e a presença do fator de transcrição STAT5, por exemplo, podem contribuir para promover a diferenciação em células CD25⁺FoxP3⁺. Essa importância da IL-2 na indução da expressão de FoxP3 foi mostrada em camundongos, que na ausência de IL-2 ou do receptor para IL-2, tiveram uma diminuição na população de células Tregs (SAKAGUCHI et al., 2008). Já foi relatado também que essas células podem ser induzidas pela presença de TGF- β (DAVIDSON *et al.*, 2007). Além disso, a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Fator nuclear Kappa B) também parece ter um importante papel para a diferenciação de células Tregs, mais do que para as células T convencionais, uma vez que camundongos knockout para algumas moléculas envolvidas nessa via de sinalização apresentaram defeitos na geração das células Tregs (SCHMIDT-SUPPRIAN et al., 2004). Entretanto, não está totalmente claro que tipo de relacionamento existe entre as vias de sinalização que promovem a seleção da linhagem de células Tregs.

As células Tregs podem atuar induzindo a supressão da resposta imune através de diversos mecanismos. A principal via já bem conhecida é pela liberação de citocinas anti-inflamatórias relevantes nesse perfil regulatório, como IL-10 e TGF- β que podem promover a anergia de células T e a disfunção de células apresentadoras de antígenos (APC). Outras ações dessas células vêm sendo descritas, tais como a indução da expressão da molécula B7-H4 por APCs, que ao interagir com células T promoveria uma parada no ciclo celular dessas células. Mecanismos envolvendo a ligação das células Tregs com a molécula CTLA-4, promoveriam a indução da expressão da molécula IDO, envolvida no metabolismo do triptofano, resultando na indução de um estado anérgico ou apoptose das células T. Além disso, as células Tregs poderiam agir via liberação de perforinas e granzimas, mecanismo semelhante ao das células citotóxicas, que levam a apoptose de APCs e células T (ZOU, 2006) (**Figura 1**).

Devido a sua fundamental importância para a função imune e seu potencial para a modulação terapêutica mostrada nesses estudos, às células Tregs têm atraído grande interesse de toda a comunidade científica.

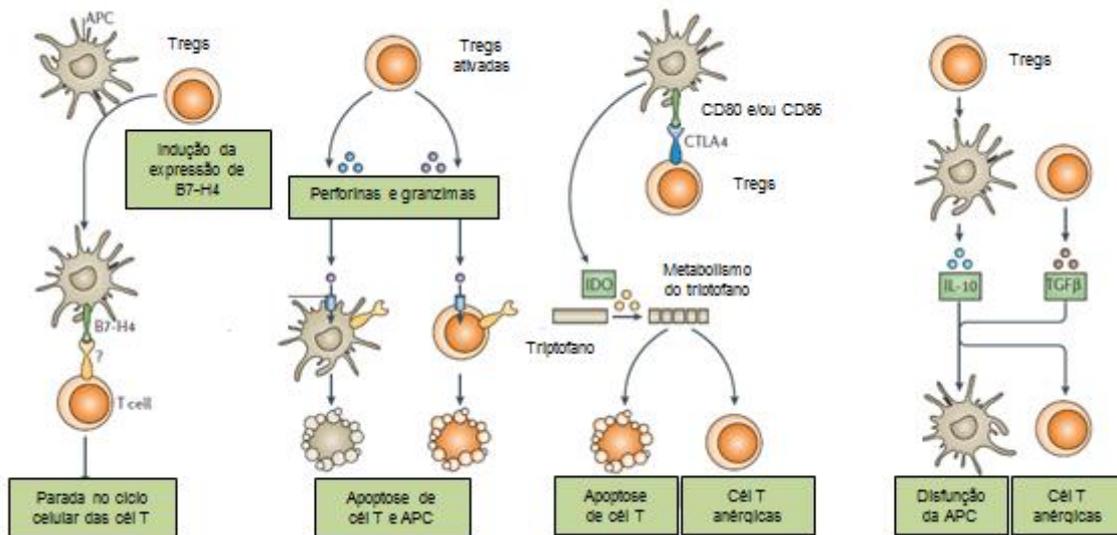


Figura 1. Possíveis mecanismos supressores das células T regulatórias. Da esquerda para a direita: indução da expressão de B7H4 por células apresentadoras de antígenos, que por sua vez promovem uma parada no ciclo celular de células T; indução de morte direta de células-alvo, como APCs e células T, via liberação de perforinas e granzimas; indução da expressão da molécula IDO, resultando na apoptose ou anergia das células T; liberação de IL-10 e TGF- β que inibem a ativação de células T e suprimem a função das APCs (Adaptado de ZOU, 2006).

1.4.1.2 Células B regulatórias

A existência de um subconjunto de células B imunorreguladoras (células B regulatórias - Bregs) desempenhando um papel na regulação imune foi relatada pela primeira vez por Wolf e colaboradores (1996) num modelo murino de EAE. Neste estudo, foram utilizados camundongos geneticamente deficientes de células B e susceptíveis a EAE. Em camundongos onde havia a presença de células B, foi observada uma recuperação completa da EAE aguda, enquanto que camundongos deficientes raramente voltaram ao normal. Devido a isso, os autores propuseram que as células B poderiam desempenhar um papel na regulação imune da EAE provavelmente por induzir um desvio da produção de citocinas T_H1 para citocinas T_H2 . Outros estudos também relataram a presença de um subconjunto de células B capazes de aumentar a recuperação de animais com EAE através da produção de IL-10 (FILLATREAU et al., 2002)

Evidências adicionais para a existência de células B regs foram mostradas em modelos de inflamação crônica. Esses estudos indicam que, como homólogas das células T, as células B também podem ser divididas em subconjuntos

reguladores funcionalmente distintos capazes de inibir respostas inflamatórias e induzir a tolerância imunológica (MIZOGUCHI et al., 2000; TSITOURA et al., 2002; MAURI et al., 2003; MANGAN et al., 2004; GILLAN; LAWRENCE; DEVANEY, 2005).

De fato, um subconjunto de células B imunorreguladoras já vem sendo funcionalmente identificado em camundongos e em seres humanos pela sua capacidade de produzir quantidades significativas de IL-10 (YANABA et al., 2008; DILILLO; HORIKAWA; TEDDER, 2011). Essas células B produtoras de IL-10 mostraram limitar a inflamação e a doença em modelos murinos de hipersensibilidade por contato, encefalomielite auto-imune experimental (EAE), lúpus, alergia e artrite induzida por colágeno (EVANS et al., 2007; MATSUSHITA et al., 2008; BOUAZIZ; YANABA; TEDDER, 2008; MADAN et al., 2009; MATSUSHITA et al., 2010). Além disso, a indução da produção de IL-10 por células B também está sendo relatado em diferentes modelos de infecção, o que em geral tem favorecido a sobrevivência do patógeno (YANABA et al., 2008; DILILLO; HORIKAWA; TEDDER, 2011).

Na tentativa de caracterizar melhor a população de células B regulatórias, Kessel e colaboradores (2012) realizaram um estudo relacionando as características fenotípicas das células Bregs. Este trabalho evidenciou que o fenótipo dessas células está relacionado com a liberação da citocina IL-10 e com a expressão do marcador CD19, utilizado para marcação de células B (KESSEL et al., 2012).

A função regulatória das células B parece ser mediada não somente pela produção de citocinas anti-inflamatórias, mas também pela capacidade das células B de interagir com células T e inibir respostas imunes prejudiciais (WEI et al., 2005; MAURI; EHRENSTEIN, 2008). Estudos mostram uma ligação entre células Bregs e Tregs, que funcionaria como uma estratégia adicional do sistema imunológico para reagir eficientemente aos desafios ambientais e prevenir a autoimunidade. As células Bregs aparentemente teriam a capacidade para regular e/ou gerar Tregs (ASHOUR; NIEDERKORN, 2006; REICHARDT et al., 2007). Em experimentos de co-cultura de células Tregs com células Bregs foi observado um aumento na expressão do fator FoxP3 em células T mediado principalmente por TGF- β (KESSEL et al., 2012). Foi demonstrado ainda que esse aumento na expressão de FoxP3 também é dependente de IL-10 (MANN et al., 2007).

Além das ações já relatadas, as células Bregs também podem executar diversas outras ações regulatórias. Estas células podem agir inibindo as células T CD8⁺, células NK e a produção de IFN- γ . Podem ainda induzir a disfunção das APCs (células apresentadoras de antígenos), inibir moléculas co-estimulatórias e moléculas de MHC, além de promover a apoptose de células B e T. Todas essas ações parecem ocorrer principalmente através da liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β . As células Bregs também podem agir via liberação de anticorpos, promovendo a eliminação de células em apoptose, redução da presença de auto-antígenos e geração de macrófagos supressivos, capazes de liberar TGF- β (MAURI; EHRENSTEIN, 2008; KESSEL et al., 2012) (**Figura 2**).

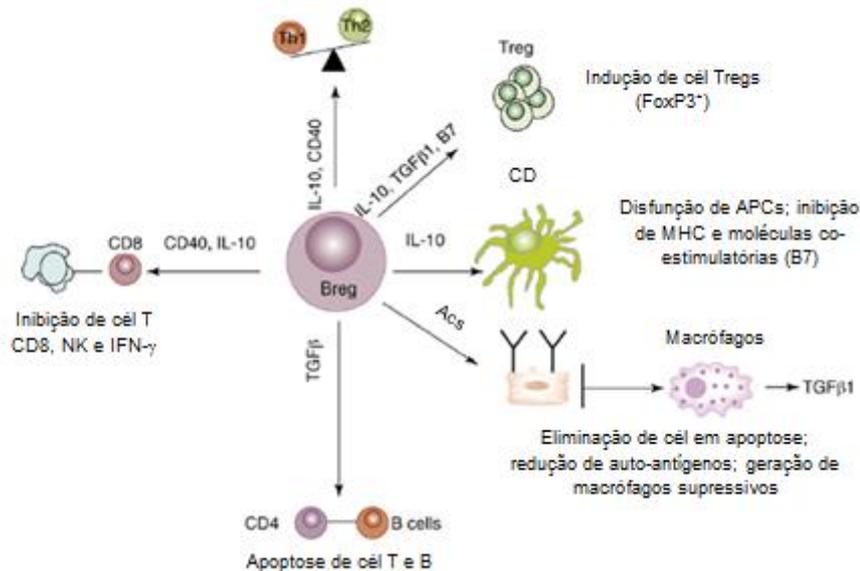


Figura 2. Mecanismos supressivos das células B regulatórias. As células Bregs podem agir: suprimindo a ativação e diferenciação de células T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK; promovendo a disfunção de células apresentadoras de antígenos através da inibição das moléculas de MHC e/ou moléculas co-estimulatórias; através da liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β que induzem a presença de macrófagos supressivos e células T regulatórias e; através da eliminação de células em apoptose e redução dos auto-antígenos (Adaptado de MAURI; EHRENSTEIN, 2008).

1.4.2 Imunomodulação e patógenos

É notório que muitas patologias são consequências de uma resposta imune descontrolada. Assim, a indução ou ativação de elementos regulatórios é a chave para o tratamento ou prevenção dos danos teciduais decorrentes dessas patologias.

Desta maneira, sobreviver a uma determinada infecção requer, portanto, a geração de uma resposta imune efetiva, porém controlada (BELKAID, 2007).

Nesse contexto, tem sido observado que diversos patógenos utilizam as mais variadas estratégias para manipular os mecanismos regulatórios do sistema imune e assim assegurar a sua sobrevivência. Uma destas estratégias envolve a indução de respostas regulatórias que são normalmente associadas com o término das respostas imunes efetoras do hospedeiro. Este tipo de manipulação pode ser realizado de forma direta, através da indução da produção de citocinas regulatórias em resposta aos constituintes do patógeno, ou indiretamente através da geração de células regulatórias. Neste último caso, o patógeno pode se valer de variadas formas tais como: I- indução de dano tecidual no intuito de aumentar a apresentação de antígenos próprios e consequentemente aumentar a atividade de células regulatórias; II- manipulação de células apresentadoras de antígenos de forma a interferir com a expressão de moléculas co-estimulatórias ou induzir a produção de citocinas que vão direcionar os linfócitos para um perfil regulatório; III- estimulação da produção de quimiocinas que promovem o recrutamento de células regulatórias para o local da infecção e IV- liberação de PAMPs que diretamente induzem a ativação de células regulatórias (BELKAID, 2007) (**Figura 3**).

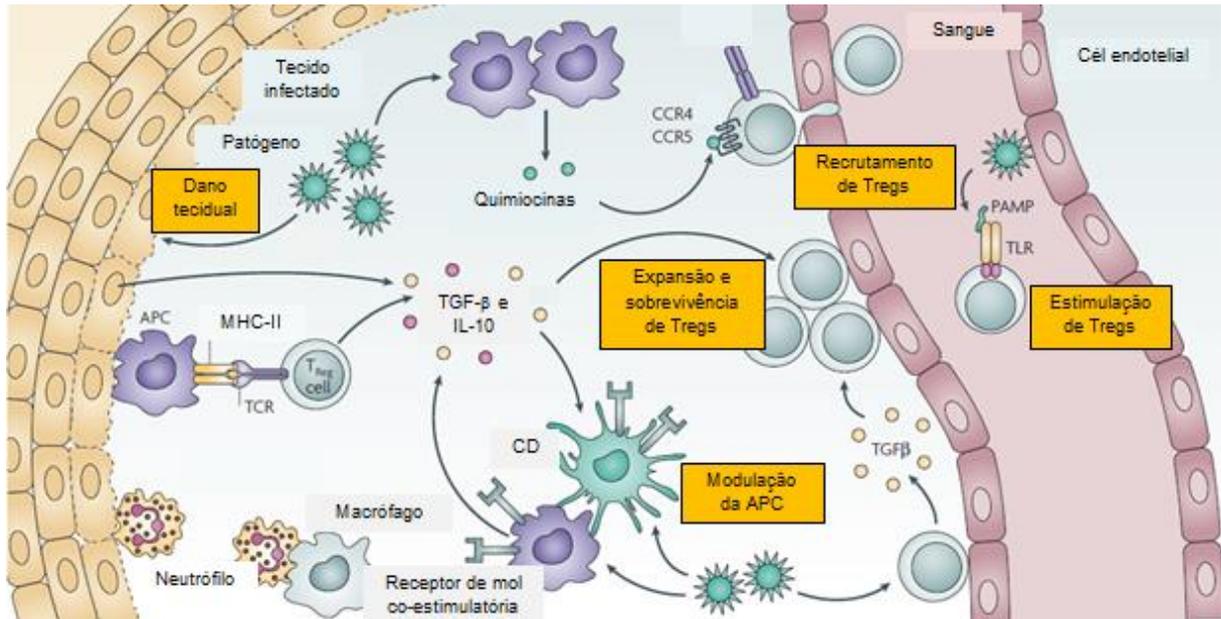


Figura 3. Potenciais estratégias usadas por patógenos para promover a indução e função de células T regulatórias. Os microrganismos podem promover a indução de células Tregs para garantir sua própria sobrevivência dentro do hospedeiro. O dano tecidual induzido pelo processo patológico pode contribuir para aumentar a atividade de células Tregs nos locais de infecção, pela apresentação de antígenos próprios ou induzindo a liberação de citocinas que promovem a indução e sobrevivência de células Tregs. Outras estratégias podem envolver a indução da produção de citocinas, que promovem o recrutamento de células Tregs; a modulação de células apresentadoras de antígenos, interferindo na expressão de moléculas co-estimulatórias ou induzindo a liberação de citocinas que direcionam os linfócitos para um perfil regulatório; e também a liberação de PAMPs que induzem diretamente a ativação de células Tregs (Adaptado de BELKAID, 2007).

Em concordância, estudos com diferentes tipos de patógenos evidenciam que a presença de células regulatórias pode contribuir para a persistência do patógeno. Hisaeda e colaboradores (2004) mostraram que a depleção de células Tregs podem proteger camundongos infectados com *Plasmodium yoelii*, cepa do parasita responsável por causar malária letal em roedores, restaurando uma resposta imune efetora capaz de erradicar o parasito. Outro estudo abordando a filariose mostra que essa doença está associada a uma supressão profunda do sistema imune do hospedeiro. Neste modelo, a infecção e a imunossupressão subsequente estão associadas a um acúmulo de células Tregs na cavidade torácica e a remoção dessas células resulta na eliminação do parasito (TAYLOR et al., 2005).

Em humanos, já foi demonstrado que a remoção de células Tregs *in vitro* é capaz de aumentar a proliferação, bem como a produção de IFN- γ , por células

mononucleares do sangue periférico oriundas de indivíduos infectados com *Plasmodium falciparum*, em resposta a antígenos da malária. Estes achados sugerem mais uma vez um papel deletério das células regulatórias na resposta imune protetora (WALTHER et al., 2005).

No contexto de células B, diversos estudos em diferentes modelos de infecção, tais como *Salmonella*, *Borrelia hermsi*, *Brugia pahangi* e *Leishmania major*, já demonstraram que a indução da produção de IL-10 pelas células B atuaria suprimindo a imunidade contra esses microrganismos. Nestes trabalhos a IL-10 estaria atuando na inibição de neutrófilos, de células NK e de células T inflamatórias, além de induzir uma regulação negativa da expressão de moléculas co-estimulatórias B7-1 e B7-2 ou inibindo a produção de IL-12 por células dendríticas (GILLAN; LAWRENCE; DEVANEY, 2005; NEVES et al., 2010; RNET et al., 2010; SINDHAVA et al., 2010). Assim, estes estudos também embasam a suposição que os patógenos são capazes de estimular mecanismos regulatórios na tentativa de subverter a resposta imune e prolongar sua sobrevivência.

Em relação à infecção por *Brucella* sp, já foi relatado que este patógeno é capaz de induzir uma diminuição na proliferação de linfócitos nas primeiras semanas após a infecção, com diminuição da resposta pró-inflamatória de linfócitos T CD4⁺ (SPERA et al., 2006). Além disso, Pasquali e colaboradores (2010), utilizando camundongos depletados de células CD4⁺CD25⁺ encontraram uma diminuição no número de bactérias presentes no baço destes animais em relação aos controles, sugerindo que esta população de células está diretamente envolvida na sobrevivência do patógeno.

Outro importante estudo que sugere a modulação da resposta pela *Brucella* sp é o trabalho de Goenka e colaboradores (2011). Estes pesquisadores demonstraram que a ausência de células B diminui a progressão da brucelose murina além de aumentar a produção de IFN- γ por células T. Estes resultados, juntamente com estudos recentes de Corsetti e colaboradores (2013), que demonstram uma diminuição na carga bacteriana em animais deficientes para a citocina IL-10, reforçam a hipótese de uma importante ação das células B regulatórias (produtoras de IL-10) na imunomodulação induzida pelo patógeno.

Assim, uma vez que diversos trabalhos tem apontado para a ação imunomoduladora das infecções por *Brucella abortus*, nosso estudo ganha importância na tentativa de elucidar os diversos mecanismos de imunomodulação

utilizados pelo patógeno para estabelecer seu processo infeccioso e sobreviver no organismo hospedeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na imunomodulação induzida pela bactéria *Brucella abortus*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a carga bacteriana presente no baço de camundongos infectados com *B.abortus* após uma, três e seis semanas de infecção.
- Avaliar o índice de proliferação celular de esplenócitos oriundos de animais infectados ou não.
- Avaliar a produção das citocinas IL-10 e IFN- γ em resposta a estimulação com *B. abortus* em esplenócitos.
- Avaliar o percentual de células T e B regulatórias em animais infectados com *B. abortus* após uma, três e seis semanas de infecção.
- Avaliar se a imunomodulação induzida pela bactéria *B. abortus* é capaz de alterar o curso de uma doença auto-imune, como a Esclerose Múltipla.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Para os experimentos realizados, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, divididos em dois grupos, cada um com quatro animais cada, sendo um grupo controle, não infectado; e um grupo infectado com a cepa virulenta de *Brucella abortus* S2308. Os mesmos grupos de animais foram utilizados para todas as análises realizadas.

3.2 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*.

3.3 Cepas bacterianas

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

3.4 Condições de cultivo bacteriano

A cepa S2308, que foi utilizada na infecção ou como antígeno na cultura de células, foi cultivada 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 ressuscitado 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 no glicerol a 30%, a uma temperatura de - 80°C. Para a contagem 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.

3.5 Inativação das bactérias pelo calor

Após a determinação da concentração bacteriana, alíquotas desta suspensão foram colocadas em banho-maria, a 80°C, durante 1,5 horas, sendo agitados a cada 15 minutos. Para certificação da morte das bactérias, amostras foram plaqueadas em meio BB solidificado e incubadas por 72 horas, a 37°C.

As bactérias inativas pelo calor são referidas neste estudo pela sigla *HKBa* (Heat-Killed *Brucella abortus*).

3.6 Infecção

Os animais foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC da cepa virulenta S2308 da *B. abortus* diluídas em 200µl de PBS. Após os tempos determinados (1, 3 e 6 semanas), esses camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, para a retirada do baço e determinação da carga bacteriana.

3.7 Carga bacteriana

O baço extraído de cada animal foi macerado em 10 mL de PBS, com o auxílio de uma peneira de aço, e serialmente diluído. As diluições foram plaqueadas, em duplicata, em meio BB ágar e colocadas em estufa microbiológica. Após três dias de incubação a 37°C, o número de unidades formadoras de colônia foi determinado. Os resultados foram expressos como a média do log de UFC de cada animal. As células excedentes do baço foram utilizadas nas culturas de esplenócitos.

3.8 Cultura de esplenócitos

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 600g. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão ACK (Ammonium-Chloride-Potassium - 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 cultivadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC) e estimuladas com *B. abortus* S2308 (MOI de 100:1). Células não estimuladas (Meio) foram usadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5,0 µg/mL - Sigma) ou lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (1 µg/mL - Sigma) serviram como controle positivo. Após 48 ou 72 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂, os sobrenadantes dos esplenócitos foram coletados para a quantificação da produção de citocinas.

3.9 Dosagem de citocinas

Para a determinação da concentração de citocinas nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos, foi usado o teste ELISA do tipo sanduíche, usando kits comerciais (BD- Becton & Dickinson Company; e R&D Systems) conforme protocolo do fabricante.

Nos sobrenadantes de cultura, foram determinadas as concentrações de IL-10, após 48 horas e IFN- γ , após 72 horas de cultivo. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

3.10 Índice de proliferação (MTT - Corante *thiazol blue tetrazolium bromido*)

Os esplenócitos foram cultivados e estimulados conforme procedimento descrito na cultura de esplenócitos. Após 72 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂, o sobrenadante das amostras foram retirados e foram adicionados 90 µl/poço de meio RPMI suplementado (10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e 10 µl/poço de MTT, (5 mg/ml). As células foram então novamente incubadas a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂ durante 4 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram retirados para adição de 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido). A reação foi lida em leitor de microplaca (Biorad) em comprimento de onda de 550 nm. O índice de proliferação foi calculado levando-se em conta a metabolização do MTT de células estimuladas e células não estimuladas.

3.11 Análise do índice de proliferação celular por citometria de fluxo

Para avaliar o índice de proliferação celular, camundongos C57BL/6 (quatro por grupo) foram infectados com *B. abortus*, (1×10^6 bactérias/animal). Após uma, três e seis semanas de infecção esses animais foram eutanasiados e os baços foram retirados para realização das análises. Os baços foram macerados com telas de metal em 10 ml de solução salina e a suspensão celular centrifugada a 600g por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 2ml de tampão ACK (Ammonium-Chloride-Potássium - 1% KHCO₃ e 8% de NH₄Cl em água destilada) e incubadas por 5 minutos para realização da lise osmótica de hemácias. Após este tempo adicionou-se solução salina até atingir o volume de 30 ml. Novamente as células foram centrifugadas e agora ressuspensas em 3 ml de meio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado com 2mM L-glutamina, 25mM HEPES, 10% de soro fetal bovino (Sigma), Penicilina (100U/ml) e Streptomycina (100Ug/ml). Após a determinação da concentração celular em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em placas de 96 poços de fundo em "U" (SARSTEDT) e estimuladas com Concanavalina A (5,0 µg/mL - Sigma). Células não estimuladas (Meio) foram usadas como controle negativo. Após 72 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂, iniciou-se o processo de marcação.

Primeiramente as placas contendo as células foram centrifugadas a 250g por 10 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa. As células foram então ressuspensas em 100 µl 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 (250g, 10 minutos) e foram adicionados, a cada poço, 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpo anti-CD3 (Clone 145-2C11), anti-CD4 (Clone GK1.5), anti-CD8 (Clone 53-6.7) e anti-NK1.1 (Clone PK136) (Becton & Dickinson) na concentração de 0,5 µg por poço. Estes anticorpos apresentavam as marcações APCCy7, FitC, PECy5 e PE, respectivamente. Seguiu-se então uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e acrescentou-se 200µl/poço de tampão de FACS seguida de centrifugação (250g, 10 minutos), sendo esse procedimento realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em 250µl 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 50.000 eventos foram adquiridos. Os resultados foram

analisados pelo software Flowjo . A zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células e a porcentagem de células foi determinada. As regiões (gates) das populações analisadas foram determinadas com base nas amostras de FMO (Fluorescence Minus One).

Para análise do índice de proliferação celular, utilizamos o percentual de células de cada tipo, determinado pela citometria de fluxo. Em seguida, o número total de células de cada tipo foi determinado multiplicando-se o percentual encontrado pela quantidade de células existentes no baço de cada animal. O índice de proliferação celular de cada animal foi então determinado dividindo-se o número total de células obtido após estimulação com Concanavalina A pelo número total de células não estimuladas.

3.12 Análise do perfil de células T regulatórias por citometria de fluxo

Para avaliar o percentual de células regulatórias, camundongos C57BL/6 (quatro por grupo) foram infectados com *B. abortus*, (1×10^6 bactérias/animal). Após uma, três e seis semanas de infecção esses animais foram eutanasiados e os baços foram retirados para realização das análises. Os baços foram macerados com telas de metal em 10 ml de solução salina e a suspensão celular centrifugada a 600g por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 2 ml de tampão ACK e incubadas por 5 minutos para realização da lise osmótica de hemácias. Após este tempo adicionou-se solução salina até atingir o volume de 30 ml. Novamente as células foram centrifugadas e agora ressuspensas em 3 ml de meio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado com 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 10% de soro fetal bovino (Sigma), Penicilina (100U/ml) e Streptomycina (100Ug/ml). Após a determinação da concentração celular em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em placas de 96 poços de fundo em “U” (SARSTEDT) e iniciou-se o processo de marcação.

A marcação foi feita com kit específico para FoxP3 (Mouse FoxP3 Buffer Set – Becton & Dickinson). Primeiramente as placas contendo as células foram centrifugadas a 250g por 10 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa. As células foram então ressuspensas em 100µl de tampão de FACS (PBS com 1% de soro fetal bovino e 0,09% de azida (NaNO_3)). Em seguida, as

placas de cultura foram submetidas a nova centrifugação (250g, 10 minutos) e foram adicionados, a cada poço, 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpos anti-CD4 (Clone GK1.5), anti-CD8 (Clone 53-6.7) e anti-CD25 (Clone PC61) (Becton & Dickinson) na concentração de 0,5ug por poço. Estes anticorpos apresentavam as marcações FITC, PECy5 e PECy7 respectivamente. Seguiu-se então uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e acrescentou-se 200 µl/poço de tampão de FACS seguida de centrifugação (250g, 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 500g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 200 µl de tampão de permeabilização (Permeabilization Buffer) pré-aquecido (37°C). As placas foram novamente centrifugadas (500g, 5 minutos), o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 200 µl de tampão de permeabilização pré-aquecido novamente. Foi realizada a incubação por 30 minutos a 37°C. Em seguida a placa foi submetida a nova centrifugação (500g, 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e foram adicionados , a cada poço, 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpos anti-FoxP3 (Clone MF23), com a marcação PE. Seguiu-se uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. Acrescentou-se 200 µl/poço de tampão de FACS seguida de centrifugação (500g, 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 coletadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 50.000 eventos foram adquiridos.

Os resultados foram analisados pelo software Flowjo. A zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células e o número e percentual de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ou CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ foi determinado. Os gates das populações analisadas foram determinadas com base nas amostras de FMO (Fluorescence Minus One).

3.13 Análise do perfil de células B regulatórias por citometria de fluxo

Para avaliar o percentual de células B, camundongos C57BL/6 (quatro por grupo) foram infectados com *B. abortus*, (1x10⁶ bactérias/animal). Após uma, três e seis semanas de infecção esses animais foram eutanasiados e os baços foram

retirados para realização das análises. Os baços foram macerados com telas de metal em 10 ml de solução salina e a suspensão celular centrifugada a 600g por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 2ml de tampão ACK e incubadas por 5 minutos para realização da lise osmótica de hemácias. Após este tempo adicionou-se solução salina até atingir o volume de 30 ml. Novamente as células foram centrifugadas e agora ressuspensas em 3 ml de meio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado com 2mM L-glutamina, 25mM HEPES, 10% de soro fetal bovino (Sigma), Penicilina (100U/ml) e Streptomycina (100Ug/ml). Após a determinação da concentração celular em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em placas de 96 poços de fundo em "U" (SARSTEDT). Foram adicionados 0,6 μ l/mL de Golgi Stop (Becton & Dickinson) e após 3 horas e iniciou-se o processo de marcação.

A marcação foi feita com kit de marcação intracelular para citocinas (Cytofix/Citoperm - Becton & Dickinson). Primeiramente as placas contendo as células foram centrifugadas a 250g por 10 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa. As células foram então ressuspensas em 100 μ l de tampão de FACS (PBS com 1% de soro fetal bovino e 0,09% de azida (NaNO_3)). Em seguida, as placas de cultura foram submetidas a nova centrifugação (250g, 10 minutos) e foram adicionados, a cada poço, 20 μ L de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpo anti-CD19 (Clone eBio1D3) (Becton & Dickinson) na concentração de 0,5 μ g por poço. Este anticorpo apresentava a marcação APC. Seguiu-se então uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e acrescentou-se 200 μ l/poço de tampão de FACS seguida de centrifugação (250g, 10 minutos), sendo esse procedimento realizado duas vezes. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 100 μ l do tampão de fixação/permeabilização (Fixation/permeabilization) e incubadas por 20 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 250 μ l de tampão BD Perm/wash (Permeabilization Buffer). As placas foram centrifugadas (250g, 10 minutos) duas vezes. O sobrenadante descartado e foram adicionados, a cada poço, 20 μ L de solução de tampão BD Perm/wash acrescida de anticorpos anti-IL-10 (Clone JES5-16E3) com a marcação PE. Seguiu-se uma incubação por 30 minutos a 4°C. Acrescentou-se 200 μ l/poço de tampão BD Perm/wash seguida de centrifugação (250g, 10 minutos), sendo esse procedimento realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em 250 μ l 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 50.000 eventos foram adquiridos.

Os resultados foram analisados pelo software Flowjo. A zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células e o número e percentual de células CD19⁺IL-10⁺ foi determinado. Os gates das populações analisadas foram determinadas com base nas amostras de FMO (Fluorescence Minus One).

3.14 Indução do Modelo de EAE

Para o experimento realizado, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, divididos em três grupos, cada um com cinco animais cada (Tabela 1). Cada animal foi imunizado por via subcutânea em ambos os lados da base da cauda com total de 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (glicoproteína associada ao oligodendrócito) (sintetizado no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo) emulsificado em Adjuvante Completo de Freund (SIGMA) suplementado com 400 µg de Mycobacterium tuberculosis (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). No dia da imunização e 48 horas após a imunização os animais receberam 300 ng/mL de toxina pertussis (Sigma, EUA, St. Louis, MO, USA) via intraperitoneal.

Tabela 1. Distribuição dos animais em grupos de acordo com a indução e tratamento/infecção.

GRUPOS	EAE	TRATAMENTO/INFECÇÃO
EAE	Induzido	Não tratado/infectado
EAE/Ba	Induzido	Infectado com <i>B.abortus</i> S2308
EAE/HKBa	Induzido	Tratado com HKBa

A análise do escore clínico foi realizada do dia 0 ao 25º dia após a indução, sendo clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na **tabela 2**, adaptada por De Paula e colaboradores (2008). O escore final foi realizado somando-se os escores apresentado em cada parte do animal. A partir do 12º dia após a indução do modelo, os animais foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC da cepa virulenta S2308 de *B. abortus* diluídas em 200µl de PBS; ou tratados com 1×10^6 UFC da cepa

S2308 de *B. abortus* morta pelo calor (HKBa) e diluídas em 200µl de PBS diariamente, do dia 12 ao 25º dia, obedecendo sempre o mesmo horário.

Tabela 2 Escala neurológica clínica para avaliar a EAE.

Parte do animal	Sinais clínicos	Escore
Cauda	Nenhum sinal clínico	0
	Perda do tonus muscular da cauda	1
	Paralisia	2
Membro-posterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma das patas do animal	1
	Fraqueza de ambas as patas do animal	2
	Paralisia de uma das patas	3
	Paralisia de ambas as patas	4
Membro-anterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma ou ambas as patas do animal	1
	Paralisia de uma ou ambas as patas do animal	2
Bexiga	Continência	0
	Incontinência	1

3.15 Eutanásia e coleta de tecidos e órgãos dos animais (Experimento com EAE)

No 25º dia após a imunização, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de xilazina (10mg/Kg) e ketamina (150mg/kg). A medula espinhal e os linfonodos foram coletados para posterior determinação da concentração de citocinas.

3.16 Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados através de teste *t* de Student, após a análise de normalidade dos dados, utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Para análise do resultado do experimento com EAE foi utilizado ANOVA seguido do teste de Bonferroni, através do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). O nível de significância adotado nas análises foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da carga bacteriana

Para avaliar o número de bactérias presentes no baço, camundongos C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* (10^6 bactérias/animal). Uma, três e seis semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados e o número de unidades formadoras de colônias foi determinado. Como observado na **figura 4**, o número de bactérias presentes no baço foi mais elevado na primeira semana, diminuindo bastante entre a primeira e a terceira semana e se estabilizando da terceira para a sexta semana após a infecção, exibindo uma tendência a cronicidade.

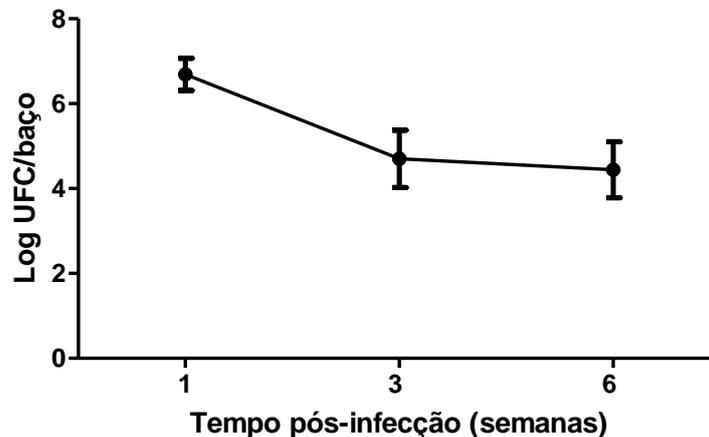


Figura 4. Curso da infecção por *B. abortus* em camundongos C57BL/6. Animais foram infectados intraperitonealmente com *B. abortus* S2308 (1×10^6 bactérias/animal) e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes no baço foi determinado nos diferentes intervalos de tempo após a infecção (n=4 por grupo).

4.2 Avaliação da proliferação celular

Como já visto na literatura, nas primeiras semanas de infecção, onde encontramos maior número de bactérias presentes no baço, a *Brucella abortus* é capaz de induzir uma imunossupressão caracterizada pela diminuição da proliferação de linfócitos em resposta ao estímulo (SPERA et al., 2006). Assim, buscando confirmar a presença dessa imunossupressão, o índice de proliferação celular foi determinado em esplenócitos de camundongos C57BL/6 após estimulação com o mitógeno Concanavalina A. Como mostrado na **Figura 5**, animais infectados com *B. abortus* apresentaram um menor índice de proliferação celular na

primeira e terceira semana pós-infecção (A e B) quando comparados a animais não infectados. Já na sexta semana (C), os animais infectados apresentam uma recuperação nesse índice, equivalendo-se aos animais não infectados. Esses resultados confirmam que a bactéria realmente é capaz de induzir uma diminuição da resposta de linfócitos, principalmente nas primeiras semanas após a infecção, corroborando com os dados vistos na previamente nos estudos de Spera e colaboradores (2006).

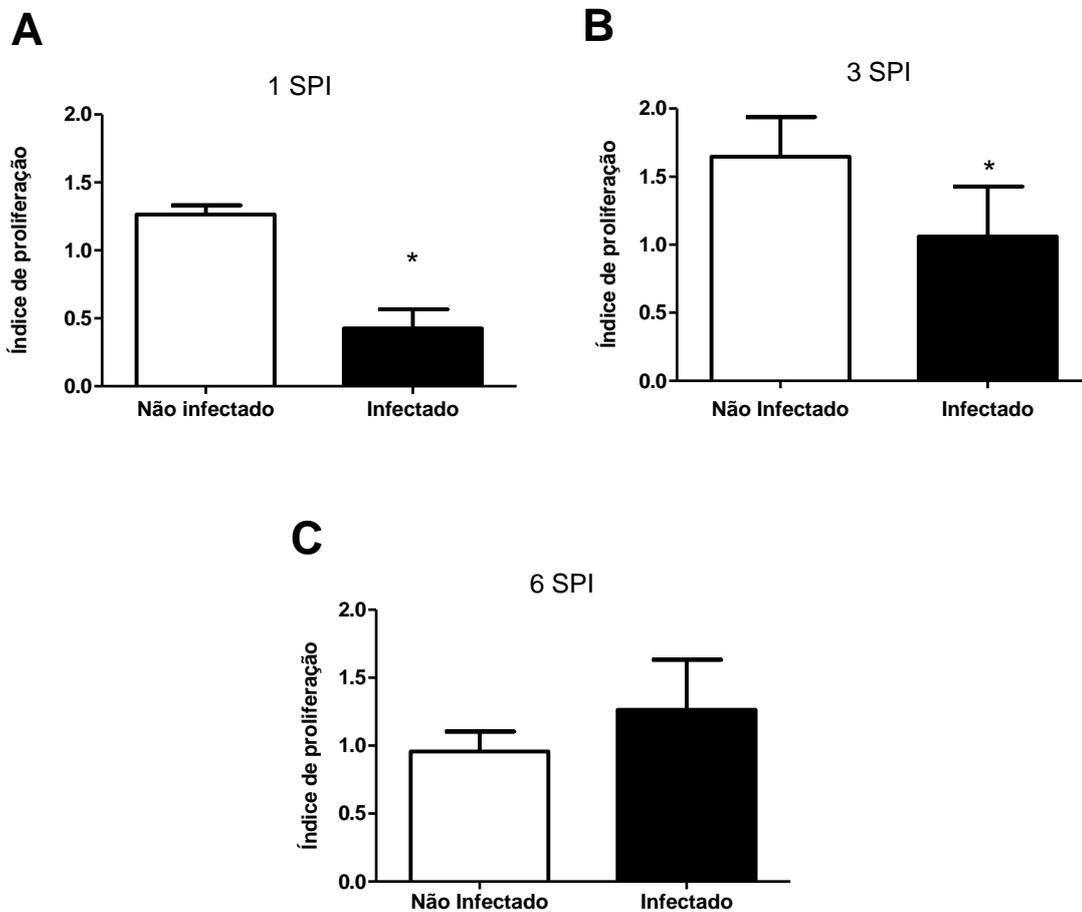


Figura 5. Análise do índice de proliferação celular em animais infectados com *B. abortus*. Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal), (n=4 por grupo). Após uma, três e seis semanas de infecção (A, B e C, respectivamente), células do baço destes animais foram retiradas e cultivadas na presença ou não do estímulo Concanavalina A ($5 \mu\text{g/mL}$). Após 72 horas de incubação o índice de proliferação celular foi avaliado pelo método de MTT. Como controles foram utilizados células provenientes de animais não infectados. O índice de proliferação foi calculado levando-se em conta a metabolização do MTT de células estimuladas e células não estimuladas. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. $p < 0,05$.

Uma vez confirmada a influência da infecção na proliferação de esplenócitos, determinamos quais tipos celulares são mais afetados. Para isso, avaliamos a proliferação de células T CD4, TCD8 e células NK. Para essa análise, células oriundas do baço de animais infectados ou não infectados foram retiradas, cultivadas na presença ou não do mitógeno Concanavalina A e então marcadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4; anti-CD3 e anti-CD8; ou anti-NK1.1. O índice de proliferação celular de cada animal foi determinado dividindo-se o número total de células obtido após estimulação com Concanavalina A pelo número total de células não estimuladas. Os gates das populações analisadas foram determinados com base nas amostras de FMO, demonstrados na **Figura 6**.

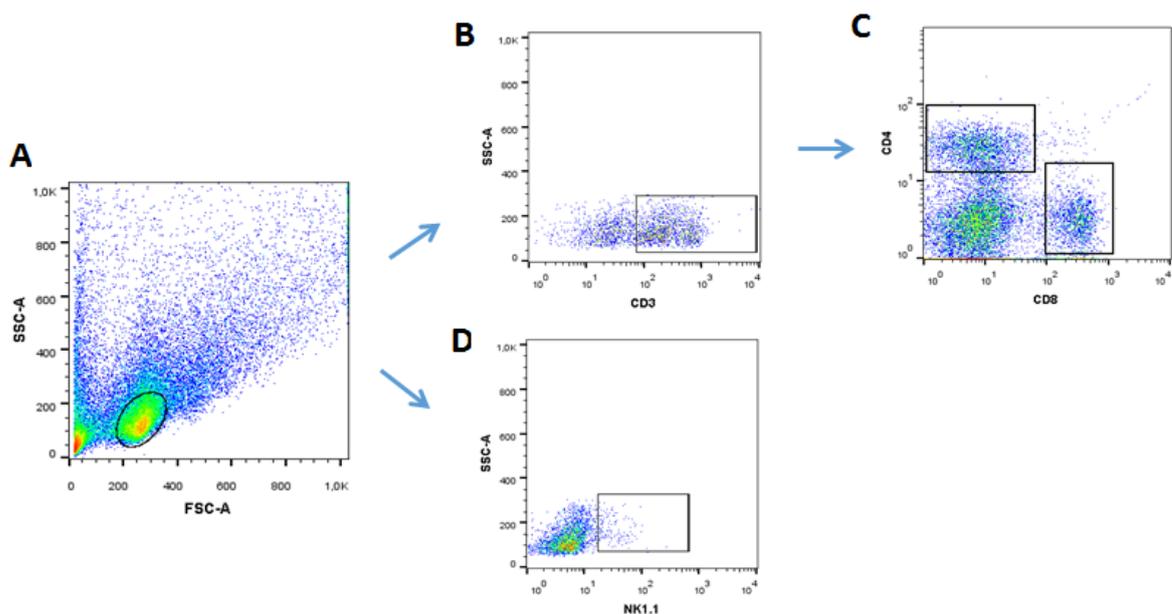


Figura 6. Determinação da população de células $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ e NK^+ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*. Dot-plots, figuras representativas de um experimento com 4 animais. (A) População de linfócitos. (B) População de células $CD3^+$. (C) População de células $CD4^+$ e $CD8^+$. (D) População de células NK^+ .

Conforme demonstrado na **Figura 7 (A)**, não foram encontradas diferenças entre os índices de proliferação de linfócitos $TCD4^+$ permanecendo semelhantes em animais infectados e não infectados, nos três tempos analisados. Entretanto, foi possível perceber que animais infectados com *B.abortus* apresentam uma menor

proliferação de células NK^+ na primeira e terceira semana pós-infecção quando comparado aos animais não infectados (**Figura 7 C**). Já na sexta semana ainda é possível perceber a existência de uma redução na proliferação destas células, porém não houve diferença significativa entre os grupos.

De forma interessante, a análise do índice de proliferação de linfócitos $TCD8^+$ (**Figura 7B**), revelou uma drástica redução na proliferação destas células ($CD3^+CD8^+$) em animais infectados com *B.abortus*, quando comparados a animais não infectados. Esta diminuição foi ainda mais evidente no decorrer dos tempos analisados (1, 3 e 6 semanas pós-infecção). Esses dados evidenciam que a bactéria é capaz de induzir uma diminuição na proliferação de linfócitos $TCD8^+$ e NK , o que, provavelmente, favorece a sobrevivência deste patógeno, uma vez que essas células são de grande relevância para o controle da infecção (OLIVEIRA; SPLITTER, 1995).

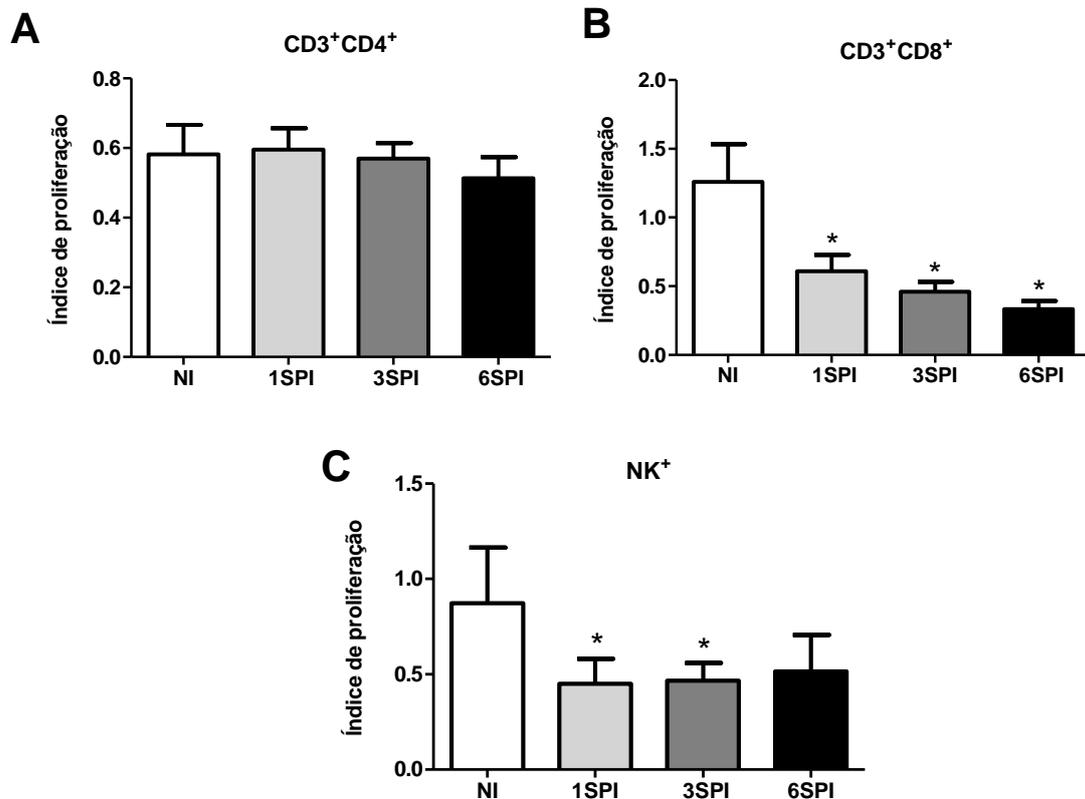


Figura 7. Índice de proliferação celular de células $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ e NK^+ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*. Animais C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal). Animais não infectados (NI) foram usados como controle (n=4 por grupo). Após uma, três ou seis semanas de infecção (1SPI, 3SPI e 6SPI, respectivamente) as células do baço foram extraídas, estimuladas ou não com ConA, lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 ou anti-NK1.1. (A) representação gráfica do índice de proliferação celular de células $CD3^+CD4^+$; (B) representação gráfica do índice de proliferação celular de células $CD3^+CD8^+$; (C) representação gráfica do índice de proliferação celular de células NK^+ . O índice de proliferação celular de cada animal foi determinado dividindo-se o número total de células obtido após estimulação com Concanavalina A pelo número total de células não estimuladas. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. $p < 0,05$.

4.3 Avaliação da produção de citocinas por esplenócitos estimulados com *B.abortus*

A resistência a patógenos intracelulares facultativos como a *Brucella sp* depende basicamente da resposta celular adquirida caracterizada pela ativação de linfócitos T e subsequente ativação e aumento do poder bactericida de macrófagos. O $IFN-\gamma$ é uma citocina diretamente envolvida neste processo e de fundamental

importância no controle da Brucelose murina (OLIVEIRA et al., 1998; MURPHY et al., 2001). Em função disso, analisamos a produção de IFN- γ em animais não infectados e animais infectados com *B. abortus* após estímulo com a bactéria viva ou com o mitógeno Concanavalina A.

Conforme demonstrado na **Figura 8** e acordando com dados da literatura (MACEDO et al., 2008), esplenócitos de animais previamente infectados com *B. abortus* produzem quantidades elevadas de IFN- γ quando estimulados *in vitro* com a bactéria viva, (A, B e C). É interessante notar que, apesar da diminuição na proliferação celular, a infecção com *Brucella* parece não afetar a produção de IFN- γ uma vez que o estímulo com Concanavalina A também resultou em aumento significativo na produção desta citocina, mesmo em animais infectados.

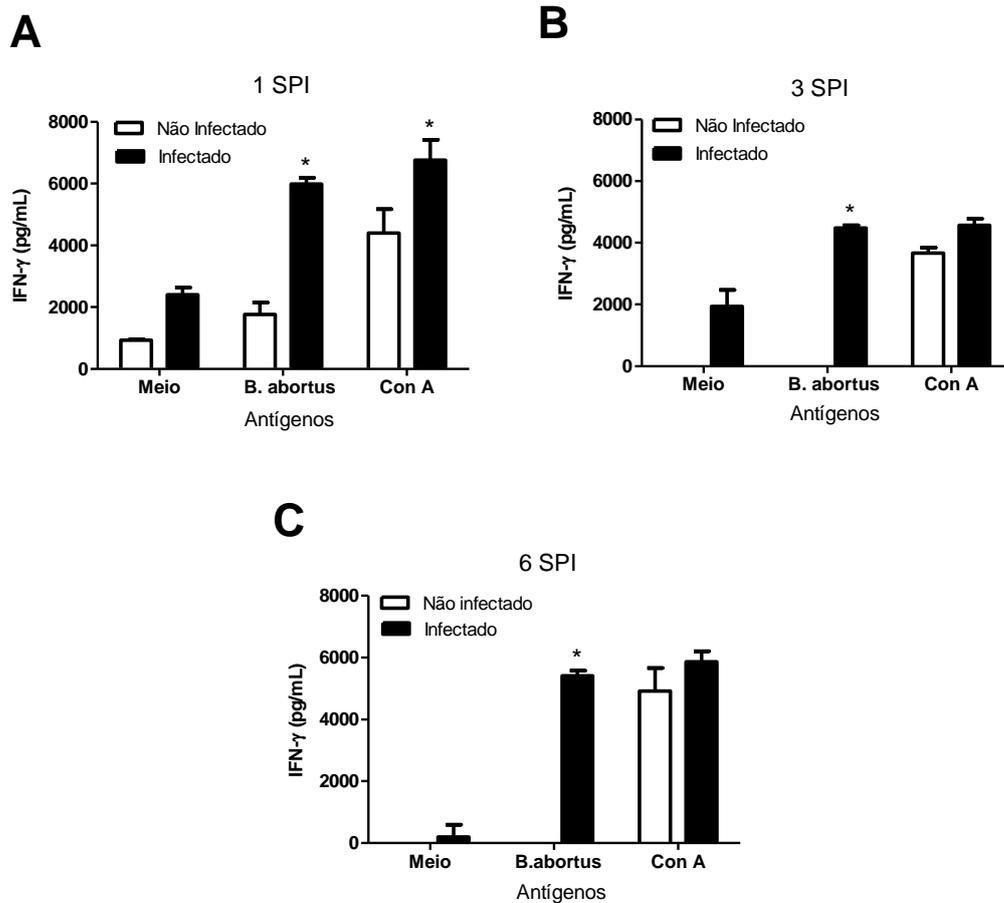


Figura 8. Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos C57BL/6. Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal), e um grupo de animais não infectados foram usados como controle (n=4 por grupo). Após uma, três e seis semanas de infecção (A, B e C, respectivamente), células do baço foram retiradas e cultivadas por 72 horas na presença dos estímulos *B. abortus* S2308 (10^2 bactérias/célula) e Concanavalina A ($5\mu\text{g/ml}$). A concentração da citocina foi determinada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. $p < 0,05$.

Além da redução do índice de proliferação celular, já foi observado na literatura um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, relevante para o estabelecimento do perfil regulatório. Essa citocina contribui para promover a supressão da resposta de linfócitos, contribuindo ainda mais para a sobrevivência da bactéria (SPERA et al., 2006). Visto isto, avaliamos a diferença na produção de IL-10 em animais não infectados e infectados com *B. abortus* durante os diferentes tempos de infecção.

Conforme demonstrado na **Figura 9**, esplenócitos de animais previamente infectados com *B. abortus* produzem uma quantidade significativamente maior de IL-

10 na primeira e terceira semana pós-infecção (A e B, respectivamente) quando comparados aos animais não infectados. Já na sexta semana (C), a produção de IL-10 em ambos os grupos analisados não apresentou diferença significativa. Os resultados sugerem que a IL-10 exerce um papel relevante na infecção por *B. abortus*, provavelmente por favorecer o estabelecimento de um perfil regulatório, contribuindo também para a sobrevivência do patógeno nas primeiras semanas de infecção.

De forma interessante, células oriundas de animais não infectados também demonstraram um aumento na produção de IL-10 quando estimulados com *B. abortus*. Uma vez que a população de esplenócitos é heterogênea, estes resultados poderiam sugerir que o patógeno também é capaz de induzir a produção desta citocina em células da imunidade inata (como macrófagos e células dendríticas) que também estão presentes entre os esplenócitos.

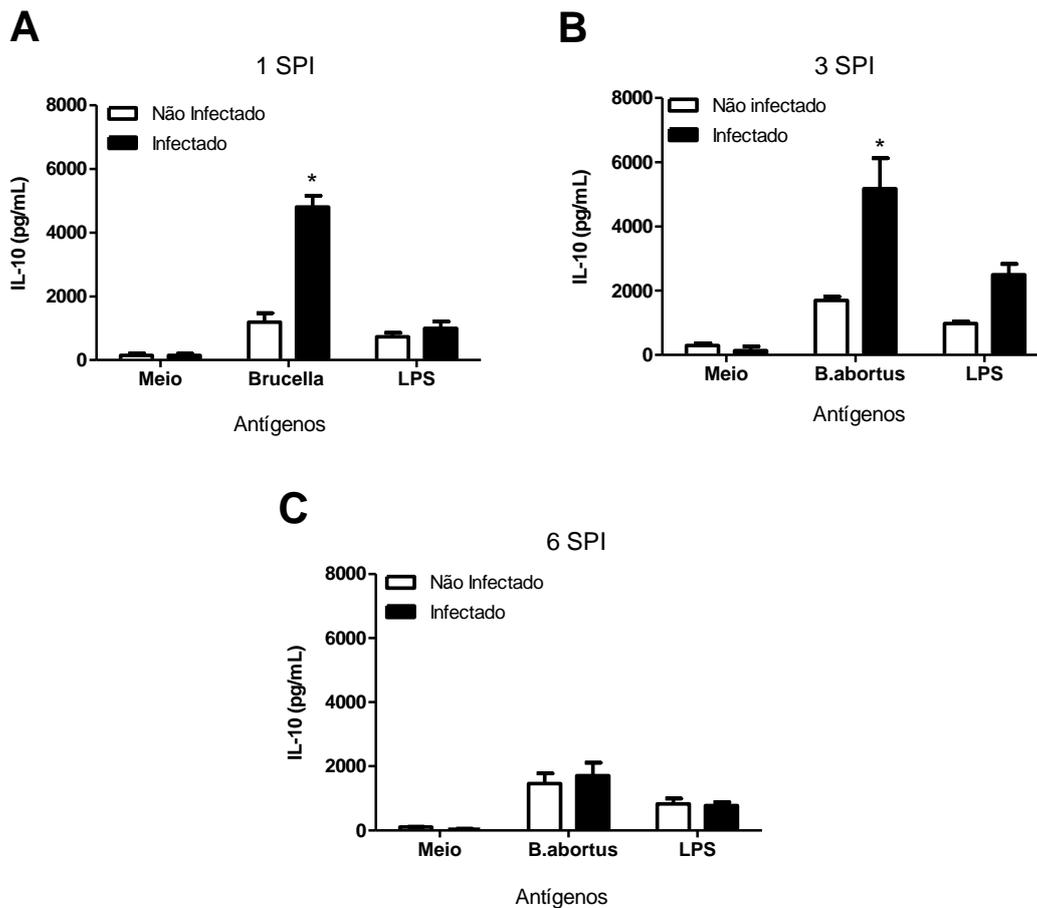


Figura 9. Produção de IL-10 por esplenócitos de camundongos C57BL/6. Animais foram infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal), e um grupo de animais não infectados foram usados como controle (n=4 por grupo). Após uma, três e seis semanas de infecção (A, B e C respectivamente), células do baço foram retiradas e cultivadas por 48 horas na presença dos estímulos *B. abortus* S2308 (10^2 bactérias/célula) ou LPS (1 μ g/ml). A concentração da citocina foi determinada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. $p < 0,05$.

4.4 Avaliação do percentual de células regulatórias em animais infectados com *B.abortus*

Conforme descrito, alguns patógenos são capazes de usar diversas estratégias para promover a indução e funções de células T regulatórias, promovendo um controle da resposta imune e contribuindo para a sua persistência (BELKAID, 2007). Uma vez que observamos uma diminuição do índice de proliferação celular em animais infectados com *Brucella abortus*, sendo essa diminuição significativa na proliferação de células NK e linfócitos TCD8, acompanhado também de um significativo aumento da produção de IL-10, avaliamos

se esse patógeno também seria capaz de influenciar na formação de células T regulatórias. Para isso, células oriundas de animais infectados foram retiradas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-FoxP3 ou anti-CD8, anti-CD25 e anti-FoxP3, e avaliadas por citometria de fluxo. Os gates das populações analisadas foram determinados com base nas amostras de FMO, demonstrados na **Figura 10**.

Adotamos a marcação com $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ ou $CD8^+/CD25^+/FoxP3^+$ como sendo característica de células Tregs, uma vez que vários estudos mostram que essas células são distinguidas principalmente pela presença deste fator de transcrição e pelo marcador CD25 (FEUERER *et al.*, 2009; BUCKNER, 2010).

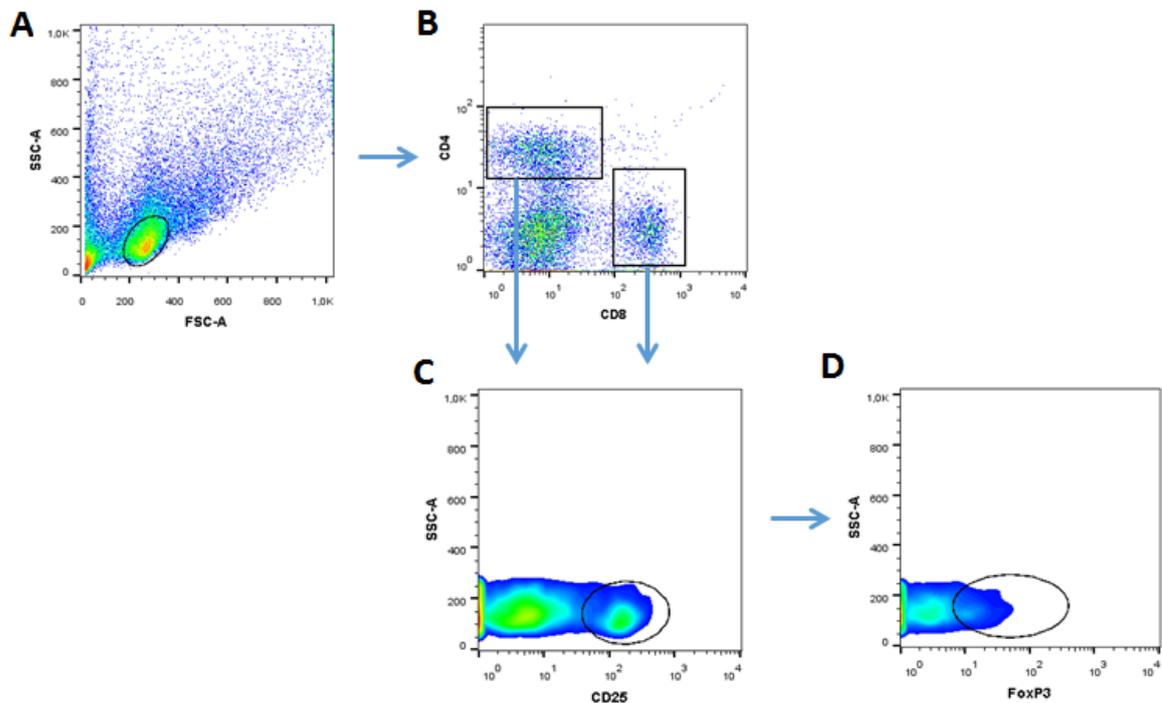


Figura 10. Determinação da população de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e $CD8^+CD25^+FoxP3^+$ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*. Dot-plots, figuras representativas de um experimento com 4 animais. (A) População de linfócitos. (B) População de células $CD4^+$ e $CD8^+$. (C) População de células $CD25^+$. (D) População de células $FoxP3^+$.

Conforme esperado, a bactéria *B. abortus* é capaz de induzir a presença de um perfil regulatório com um aumento significativo no número de células T $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ na terceira semana pós-infecção, quando comparado ao grupo não infectado (**Figura 11 B**). De forma surpreendente, também encontramos um

aumento no número de células T CD8⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ na terceira e sexta semana pós-infecção comparando-a ao grupo não infectado (**Figura 11 D**). Entretanto, o percentual de células regulatórias permaneceu maior no grupo de animais não infectados quando comparados com a primeira e sexta semana pós-infecção, e equivalente ao percentual encontrado na terceira semana (**Figura 11 A e C**). Embora o percentual dessas células no grupo controle seja inicialmente maior ou equivalente ao grupo não infectado, esse resultado precisa ser analisado com cautela.

Uma vez que o cálculo do percentual é relativo a população total de células, o recrutamento e a proliferação dos mais variados tipos celulares ocasionado pela infecção com o patógeno, pode causar uma significativa redução do percentual de um tipo celular em particular, mesmo que a quantidade destas células tenha aumentado.

Estes resultados permitem sugerir que a bactéria é capaz de induzir um perfil regulatório estimulando a diferenciação de células T CD4 e T CD8 regulatórias, favorecendo assim sua sobrevivência no hospedeiro.

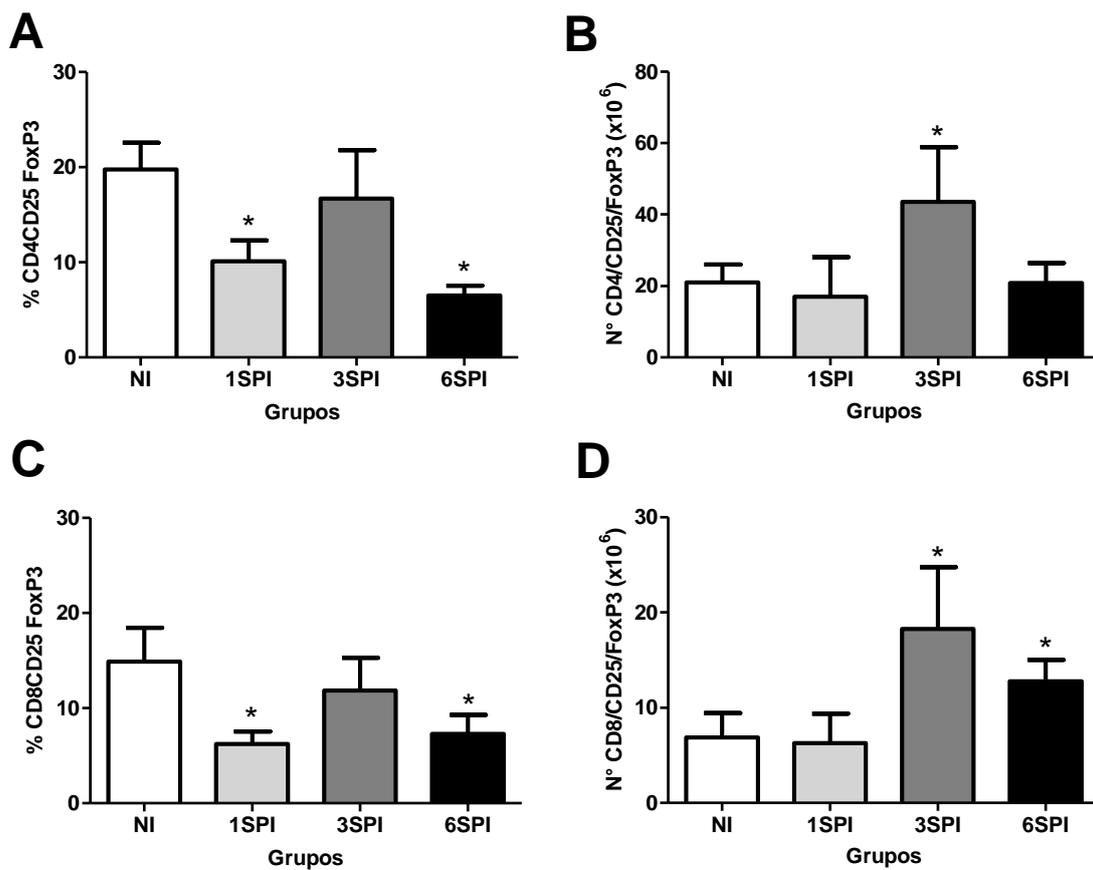


Figura 11. Percentual e número de células regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ no baço de animais infectados com *B. abortus*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal), e, após uma, três e seis semanas de infecção (1SPI, 3SPI e 6SPI respectivamente) foram sacrificados para extração de células do baço. Um grupo de animais não infectados foi usado como controle (n=4 por grupo). Estas células foram então lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-FoxP3 ou, anti-CD8, anti-CD25 e anti-FoxP3. (A e B) representação gráfica do percentual e número de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. (C e D) representação gráfica do percentual e número de células CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺. Os valores referentes ao número de células foram obtidos multiplicando-se o valor do percentual encontrado pelo número de células do baço de cada tipo. Os percentuais de células FoxP3⁺ são referentes ao percentual desta população encontrado dentro da população de células CD25⁺, sendo o valor desta última população referente ao seu percentual dentro da população de células CD4⁺ ou CD8⁺ (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. p<0,05.

Uma vez que diversos estudos tem demonstrado que alguns patógenos podem ainda induzir a presença de um perfil regulatório pelo aumento de células B produtoras de IL-10 (Células B regulatórias - Bregs) (MOORE et al., 2001; YANABA

et al., 2008; DILILLO; HORIKAWA; TEDDER, 2011), associado ao fato de animais deficientes em células B serem mais resistentes a infecções por *B. abortus* (GOENKA et al., 2011), avaliamos se a infecção por este patógeno é capaz de influenciar o número e percentual deste tipo celular. Para isso, células oriundas de animais infectados ou não foram retiradas e marcadas com anticorpos anti-CD19 e anti-IL-10 e avaliadas por citometria de fluxo. Os gates das populações analisadas foram determinados com base nas amostras de FMO, demonstrados na **Figura 12**.

Para essa análise, utilizamos a marcação com CD19, marcador de células B, e com IL-10, uma vez que estudos mostram que as células B produtoras da citocina IL-10 apresentam um caráter regulatório (YANABA et al., 2008; DILILLO; HORIKAWA; TEDDER, 2011).

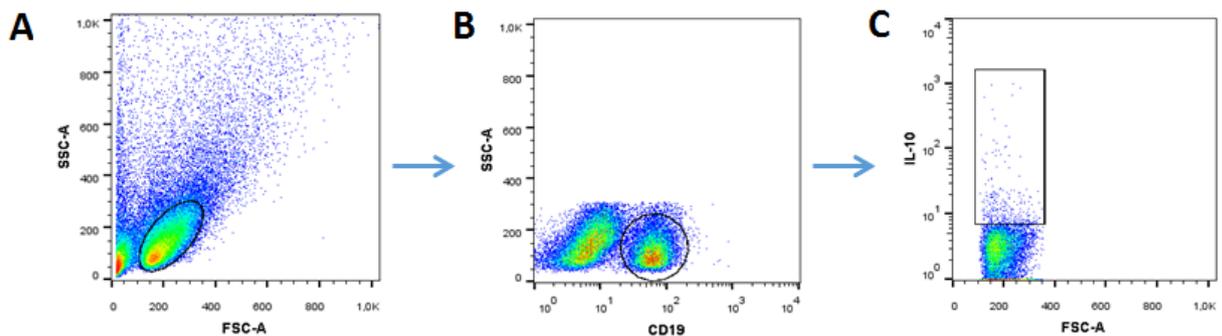


Figura 12. Determinação da população de células CD19⁺IL-10⁺ no baço de animais infectados ou não com *B. abortus*. Dot-plots, figuras representativas de um experimento com 4 animais. (A) População de linfócitos. (B) População de células CD19⁺. (C) População de células produtoras de IL-10.

Conforme mostra a **Figura 13 B**, a infecção por *B. abortus* induziu um significativo aumento no número de células B regulatórias na terceira e sexta semana pós-infecção, quando comparados ao grupo não infectado. Com relação ao percentual dessas células (**Figura 13 A**), observamos que animais infectados apresentam um percentual significativamente menor na primeira e sexta semana, e equivalente na terceira semana, comparados ao grupo controle. Entretanto, como já mencionado anteriormente, a análise do percentual por si só pode não refletir a

realidade visto que animais infectados apresentam um recrutamento de outros tipos celulares para o local da infecção, o que influencia no cálculo do percentual.

Esses resultados em conjunto demonstram que a bactéria induz a presença de um perfil regulatório com a produção de células T e B regulatórias, principalmente na terceira semana pós-infecção, onde o número dessas células foi mais elevado.

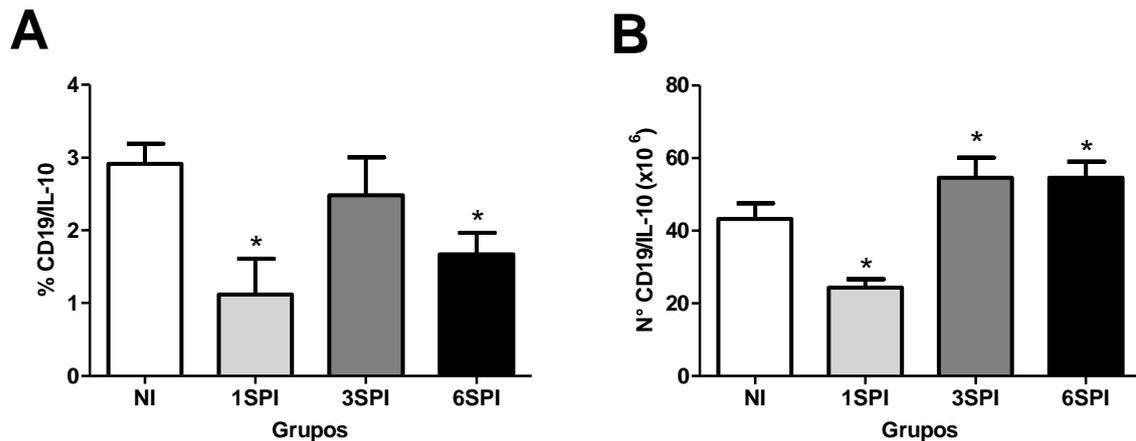


Figura 13. Percentual e número de células CD19⁺ produtoras de IL-10 no baço de animais infectados com *B. abortus*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal), e, após uma, três e seis semanas de infecção (1SPI, 3SPI e 6SPI respectivamente) foram sacrificados para extração de células do baço. Um grupo de animais não infectados foi usado como controle (n=4 por grupo). Estas células foram então lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD19 e anti-IL-10 (A) representação gráfica do percentual de células CD19⁺ produtoras de IL-10 (B) representação gráfica do número de células CD19⁺ produtoras de IL-10. Os valores referentes ao número de células foram obtidos multiplicando-se o valor do percentual encontrado pelo número de células do baço de cada tipo. Os percentuais de IL-10 são referentes ao percentual desta população encontrado dentro da população de células CD19⁺ (*) significativo em relação aos animais não infectados, por teste *t* de student. $p < 0,05$.

4.5. Influência da imunossupressão induzida pela *B. abortus* no curso da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

Como demonstrado, a *B. abortus* é capaz de induzir um ambiente imunossupressor, com a presença de células de perfis regulatórios, diminuição da proliferação de linfócitos e presença de IL-10. Em muitas doenças, a presença de um quadro inflamatório intenso pode ser suprimida pela presença de células com

perfil regulatório e citocinas anti-inflamatórias (ELLIOTT *et al.*, 2000; ELLIOTT *et al.*, 2003; BRAAT *et al.*, 2007).

Nesse contexto, estudos demonstram que alguns patógenos podem influenciar na recuperação de algumas doenças, por induzir determinadas respostas no sistema imune, seja promovendo a presença de uma forte resposta T_H2 , que inibe respostas do tipo T_H1 , ou estimulando a formação de componentes com atividade anti-inflamatória (ELLIOTT *et al.*, 2000; ELLIOTT *et al.*, 2003; BRAAT *et al.*, 2007). Assim, avaliamos se o perfil regulatório induzido pela bactéria *B. abortus* seria capaz de promover uma melhora no quadro clínico da EAE, um modelo animal para estudo da esclerose múltipla. Esta doença apresenta natureza autoimune e é caracterizada por um processo inflamatório crônico no Sistema Nervoso Central ocasionando a destruição da bainha de mielina que reveste o axônio dos neurônios e interferindo diretamente na condução do impulso nervoso. Conseqüentemente, esses processos geram uma interferência na comunicação do cérebro, medula espinhal e outras áreas do corpo, podendo, em casos mais graves, levar a perda das capacidades motoras, tornando-se uma doença debilitante (KAWAKAMI *et al.*, 2004; BASSO *et al.*, 2008; GOVERMAN, 2009). No modelo de EAE, o animal apresenta um comprometimento da cauda, membros anteriores e posteriores, e, em casos mais graves, incontinência urinária. Os principais sinais clínicos incluem a perda do tônus muscular e fraqueza dos membros, podendo evoluir para paralisia (DE PAULA *et al.*, 2008).

Para esta análise, animais C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de indução da EAE (descrito no item 3) e, após o 12º dia de indução, estes animais foram infectados com a cepa virulenta de *B. abortus* (S2308). Alternativamente, animais submetidos ao protocolo de EAE foram tratados com a bactéria morta pelo calor, HKBa, do dia 12 ao 25º dia pós-indução, quando então foi realizada a eutanásia. O 12º dia foi escolhido para o início da intervenção uma vez que coincide com o início dos sintomas (garantindo o sucesso da indução) e está a uma semana do pico da doença, que ocorre entre o 17º e 19º dia pós-indução (CASTRO *et al.*, 2012; DIAS, *et al.*, 2015). O score clínico da doença foi então acompanhado diariamente até o 25º dia, quando os animais foram eutanasiados.

Como demonstrado na **Figura 14**, no grupo EAE, o pico do escore clínico ocorreu entre o 14º e o 17º dia pós-indução, decrescendo a partir desse ponto. No grupo EAE/Ba, esse pico foi presente no 15º e 16º dia pós-indução, decrescendo a

partir desse ponto até o 20º dia, tornando a aumentar significativamente no 21º dia e assim permanecendo até o dia do sacrifício. Já no grupo EAE/HK*Ba*, o pico se deu no 16º dia pós-indução, decrescendo a partir desse ponto e apresentando resultado semelhante ao grupo EAE. Esses resultados indicam que a infecção com *B. abortus* não foi capaz de promover uma recuperação no escore clínico dos animais com EAE, mostrando uma elevação significativa na pontuação do mesmo quando comparado aos demais grupos. O tratamento com HK*Ba* não apresentou melhora significativa nos animais com EAE, se assemelhando aos resultados encontrados no grupo EAE sem tratamento.

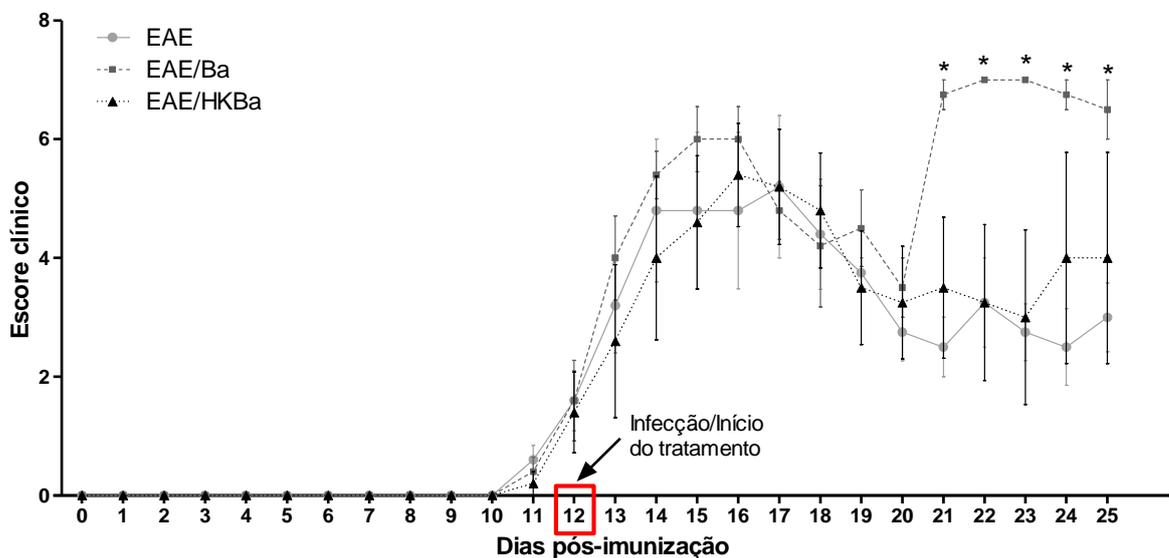


Figura 14. Média do escore clínico em animais submetidos ao protocolo de EAE. Escore clínico dos camundongos imunizados com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 por grupo). Os sinais clínicos foram registrados do dia 0 ao dia 25 após a imunização. A infecção com *B. abortus* e o tratamento com HK*Ba* tiveram início no 12º dia após a imunização. EAE= grupo imunizado, não tratado/infectado; EAE/*Ba* = grupo imunizado e infectado com *Brucella abortus*; EAE/HK*Ba* = grupo imunizado e tratado com HK*Ba*. * Significativo em relação ao grupo EAE, por ANOVA seguido de teste de Bonferroni post hoc. p<0,05.

5 DISCUSSÃO

A brucelose é uma zoonose presente em diversas regiões do mundo, capaz de, eventualmente, infectar o homem e vários animais domésticos (HE, 2012; AVILA-CALDERON et al., 2013). O tratamento para a brucelose humana tem se demonstrado eficiente, entretanto em humanos, não existem vacinas capazes de evitá-la (PAPPAS et al., 2006^a). Assim sua prevenção torna-se dependente do controle da doença no animal hospedeiro (BRIONES et al., 2001).

Além das significativas perdas econômicas relacionadas ao rebanho e produtos de origem animal, a *Brucella* sp tem ainda um grande potencial como arma biológica, em função do seu alto poder infeccioso, o que torna relevante o estudo de tal doença (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002; GUIHOT, BOSSI, BRICAIRE, 2004). Além disso, a melhor compreensão de seus mecanismos imunológicos contribui para o futuro desenvolvimento de novas estratégias vacinais e para investigação do potencial bacteriano no tratamento de outras patologias, decorrentes de sua capacidade de induzir mudanças na presença e perfil de células do sistema imunológico.

Neste trabalho, analisamos a capacidade da bactéria *Brucella abortus* em induzir um perfil imunossupressor, através da análise de proliferação celular, produção de citocinas e perfil de células regulatórias.

A diminuição nos índices de proliferação celular foi evidenciada em camundongos C57BL/6 na primeira e terceira semana pós-infecção com *B.abortus* (**Figura 5**), confirmando que a bactéria é capaz de induzir uma diminuição da resposta de linfócitos, corroborando com os dados vistos na literatura nos estudos de Spera e colaboradores (2006). Essa diminuição ocorreu de forma significativa na proliferação de células NK e de células T CD8⁺ (**Figura 7 B e C**).

A ação das células NK na infecção pela *Brucella* sp tem sido bastante controversa. Uma vez ativadas, as células NK agem induzindo a lise celular via perforinas e granzimas ou através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (VIVIER et al., 2008) o que, teoricamente, contribuiria para a eliminação do patógeno. Apesar disso, um antigo e clássico trabalho realizado por Fernandes e colaboradores (1995) demonstrou que as células NK não possuem uma ação crucial na resposta imune contra a *Brucella* sp uma vez que sua depleção

não foi capaz de afetar a eliminação da bactéria. Além disso, Akbulut e colaboradores (2007) também não encontraram nenhuma alteração na população de células NK e NKT em pacientes infectados com *Brucella sp*, tratados ou não. Entretanto, de forma contraditória, um interessante estudo realizado por Dornand e colaboradores (2004) demonstrou que “*in vitro*”, as células NK são ativadas, secretam citocinas (IFN- γ e TNF- α) e impedem o desenvolvimento intracelular do patógeno, sugerindo uma ação para estas células no combate a *Brucella*. Estas contradições tornam evidente a necessidade de mais estudos envolvendo este tipo de célula no contexto desta infecção.

Considerando os trabalhos relatados e a diminuição na proliferação encontrada no presente estudo, é razoável inferir que as células NK possam executar um importante papel no controle da Brucelose. Apesar disso, é provável que o patógeno seja capaz de evitar este controle, impedindo que estas células se proliferem e executem suas ações. Esta hipótese ganha ainda mais força com o trabalho de Salmeron e colaboradores (1992) que demonstraram uma diminuição na atividade de células NK derivadas do sangue periférico em pacientes infectados com *B. abortus*. Segundo estes autores, a adição de IL-2, uma citocina relacionada a proliferação celular, foi capaz de reverter este quadro. Assim como ocorreu com as células NK, também observamos uma diminuição significativa na proliferação de linfócitos TCD8⁺ (**Figura 7 B**), sendo esta proliferação gradativamente menor com o passar do tempo pós-infecção. Estes achados sugerem que, de alguma forma, o patógeno é capaz de influenciar nas respostas destas células, favorecendo sua sobrevivência e o estabelecimento de uma infecção crônica. Como já demonstrado, linfócitos T CD8⁺ são extremamente importantes na eliminação da infecção, pois, além de contribuírem com a produção de IFN- γ e TNF- α , também possuem função citotóxica, reconhecendo e eliminando as células-alvo infectadas, através da liberação de perforinas e granzimas (OLIVEIRA; SPLITTER, 1995; HE et al., 2001).

Estudo de Barrionuevo e colaboradores (2013) mostrou uma diminuição na resposta de células T CD8⁺, relatando que a bactéria *Brucella abortus* é capaz de induzir uma baixa expressão de MHC de classe I, o que restringe a apresentação de antígenos bacterianos a essas células, evitando respostas citotóxicas e promovendo um mecanismo de escape.

Corroborando com esses dados, estudos de nosso grupo, realizados por Queiroz e colaboradores (2013) demonstraram que animais infectados com *B.*

abortus e tratados com a droga Talidomida apresentaram uma significativa redução na carga bacteriana esplênica. Essa redução foi associada ao aumento no percentual e na atividade de células T CD8⁺ encontrada nestes animais evidenciando que a presença desses linfócitos potencializa a eliminação da bactéria.

A ação de patógenos sobre células T CD8⁺ também tem sido evidenciada em outros modelos de infecção. Estudos mostram que existe uma redução no percentual e/ou número de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico durante infecções por *Plasmodium* sp (KASSA et al., 2006; BORGES, FONTES, DAMAZO, 2013; HOJO-SOUZA et al., 2015) e que essas reduções têm sido atribuídas à apoptose dessas células, à realocação de células T para os locais de inflamação, ou outros fatores, como indução da supressão dessas células (TOURÉ-BALDÉ, SARTHOU, ROUSSILHON, 1995; HVIID et al., 1997; HVIID, KEMP, 2000; OCAÑA-MORGNER, MOTA, RODRIGUEZ, 2003; RICCIO et al., 2003).

Além da importância na redução do índice de proliferação celular, já foi observado que a presença da citocina IL-10 contribui para promover a supressão da resposta de linfócitos, contribuindo ainda mais para a sobrevivência da bactéria (SPERA et al., 2006). Visto isto, demonstramos que esplenócitos de animais previamente infectados com *B. abortus* produzem uma quantidade significativamente maior de IL-10 na primeira e terceira semana pós-infecção (**Figura 9**), sugerindo que essa citocina exerce um papel relevante neste modelo de infecção provavelmente por favorecer o estabelecimento de um perfil regulatório, contribuindo também para a sobrevivência do patógeno nas primeiras semanas de infecção.

A importância da IL-10 vem sendo demonstrada em diversos estudos e já foi visto que a presença desta citocina promove uma desregulação ou bloqueio na produção de citocinas pro-inflamatórias (SELLON et al., 1998; FIORENTINO et al., 1991^a; FIORENTINO et al., 1991^b), mostrando sua capacidade em controlar respostas inflamatórias e evitar a patologia. Um estudo de Corsetti e colaboradores (2013) avaliou a contribuição da IL-10 na patologia e resposta imune durante a infecção com *B. abortus*, demonstrando que camundongos KO para essa citocina apresentavam reduzidas cargas bacterianas quando comparados a camundongos selvagens, com eliminação da infecção após 14 semanas. Além disso, a análise histológica demonstrou que tanto camundongos KO para IL-10 quanto selvagens desenvolveram granulomas e necrose no tecido hepático, ocorrendo uma diminuição significativa dessas lesões em animais KO na sexta semana pós-infecção,

acompanhado de um aumento no número de células Tregs. Esses resultados demonstram que a ausência de IL-10 aumenta a resistência à infecção por *B.abortus* e promove um equilíbrio entre a eliminação do patógeno e a patologia.

Além disso, a ação da IL-10 causa uma supressão da resposta imune, uma vez que essa citocina é capaz de inibir outras células, como macrófagos e células dendríticas impedindo a ativação de uma resposta celular de perfil T_H1 (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MOORE et al., 2001). Desta maneira, o aumento nos níveis de IL-10 também poderia contribuir para o estabelecimento do microrganismo infeccioso, beneficiando o patógeno. Assim, a produção de IL-10 encontrada no presente estudo poderia estar associada a maior sobrevivência do patógeno e está de acordo com os dados encontrados em diversos estudos que demonstram um aumento na eliminação de patógenos na ausência da citocina IL-10 (WAGNER et al., 1994; DAI; KOHLER ; BROMBACHER ,1997; BELKAID et al., 2001; MURRAY et al., 2002; CORSETTI et al., 2013). Além disso, observamos uma diminuição na produção de IL-10 na sexta semana pós-infecção, que foi semelhante à produção encontrada em animais não infectados, associado a uma estabilidade da carga bacteriana encontrada nesse mesmo tempo. A diminuição dos níveis dessa citocina pode estar relacionada a um aumento na produção de outros componentes de regulação do sistema imunológico, como a citocina anti-inflamatória TGF- β , o que promoveria uma manutenção do número de UFC presente no baço desses animais infectados, mesmo na ausência de níveis significativos de IL-10. Corroborando com esta hipótese, Corsetti e colaboradores (2013) demonstraram que na ausência de IL-10, ocorre ativação de células T reguladoras e produção de TGF- β durante a infecção por *Brucella*, sendo o TGF- β presente a partir da segunda semana pós-infecção, com níveis mais elevados na sexta semana.

Associado a todos esses resultados, foi observado um aumento no número de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) e células B produtoras de IL-10, chamadas de B10 (**Figura 11 B** e **13 B** respectivamente) evidenciados principalmente na terceira semana pós-infecção. Estes resultados indicam que a *B. abortus* pode induzir a presença dessas células com características imunossupressoras no intuito de controlar a resposta imunológica e assim favorecer sua sobrevivência e desenvolvimento no hospedeiro. Estes achados estão corroborados com estudos de Belkaid (2007) e Dilillo e colaboradores (2011), que

relatam que a presença desses elementos regulatórios favorece o patógeno em diferentes modelos de infecção.

De forma surpreendente, também encontramos um aumento no número de linfócitos T CD8 com característica regulatória (expressando o marcador CD25 e o fator de transcrição FoxP3) na terceira e sexta semana pós-infecção (**Figura 11 D**) mostrando que a bactéria não só induz a diferenciação de células T CD4⁺ regulatórias, mas induz uma imunossupressão envolvendo também outros tipos celulares, inclusive células T CD8⁺ e células B. Estudos demonstram que essas células regulatórias podem atuar na supressão de respostas imunes e diminuição de respostas inflamatórias (GERSHON, 1975; CAMPBELL; KOCH, 2011), contribuindo para a sobrevivência do patógeno.

É interessante notar que, ao avaliarmos o número de UFC (**Figura 4**), é possível observar uma maior carga na primeira semana pós-infecção, associado ao menor índice de proliferação celular encontrado. Da primeira para terceira semana, ocorre uma queda significativa na quantidade de bactérias presentes no baço. Esta queda pode estar associada a maior efetividade da resposta imune visto que, neste tempo, existe uma menor quantidade de células T e B regulatórias. Já na terceira semana, o número de células T e B regulatórias aumentam significativamente e o número de UFC no baço permanece praticamente estável da terceira para sexta semana. Assim, é provável que o aumento no número de células com caráter regulatório, esteja modulando a resposta imune contra o patógeno e assim contribuindo para sua sobrevivência. Apesar destes interessantes resultados, diversos outros estudos ainda se fazem necessários no intuito de confirmar a forma de ação destas células regulatórias, bem como os mecanismos pelos quais o patógeno é capaz de influenciá-las.

Por fim, uma vez que a *Brucella abortus* é capaz de induzir uma imunossupressão no sistema imune, o próximo passo foi avaliar se essa indução seria capaz de melhorar o curso de uma doença autoimune, de caráter inflamatório, como a Esclerose Múltipla.

A esclerose múltipla é uma doença crônica, difundida em todo o mundo, que se inicia geralmente com um surto, mas a maioria dos pacientes começa a desenvolver deficiências neurológicas progressivas (COMPSTON; COLES, 2008). A etiologia da doença ainda não é bem definida, mas acredita-se que fatores genéticos e ambientais contribuam para seu desenvolvimento (HOLMØY T; HESTVIK, 2008;

GOURRAUD et al., 2012). A doença parece ser mediada por mecanismos imunológicos, no entanto, os aspectos patogênicos envolvem também os neurônios, axônios e sinapses nervosas (MCFARLAND; MARTIN, 2007). A patogênese da progressão da EM e o envolvimento neuro-axonal ainda são complexos e não completamente elucidados (IMITOLA; CHITNIS; KHOURY, 2006).

A EAE é o modelo animal mais utilizado para o estudo da esclerose múltipla, pois apresenta um predomínio do caráter inflamatório e da desmielinização, característico da doença (YIN et al., 2010). É considerado um modelo de inflamação aguda e acredita-se que a doença seja ocasionada pela exacerbação de uma resposta inflamatória, causada principalmente por células T (KOMIYAMA et al., 2006; COMPSTON; COLES, 2008; DOLEI et al., 2014). Os linfócitos T CD4⁺ são um dos principais mediadores dessa inflamação, e age principalmente através da secreção de IFN- γ , o que leva a ocorrência de lesões (COMPSTON; COLES, 2008). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias liberadas por células T_H17 também são de grande relevância para ocorrência desse processo (LANGRISH et al., 2005; STEINMAN, 2007).

Um estudo ainda mostrou que pacientes com esclerose múltipla apresentam uma perda significativa de células Tregs quando comparados a indivíduos saudáveis (VIGLIETTA et al., 2014), sendo que sua redução tem sido relacionada com a baixa expressão do fator de transcrição FoxP3 (VENKEN et al., 2008). Esse subconjunto de células regulatórias provavelmente poderiam exercer um papel importante na inibição de células T auto-reativas, minimizando o processo inflamatório da doença (MCFARLAND; MARTIN, 2007). Além disso, já foi demonstrado que a presença de um subconjunto de células B foi capaz de aumentar a recuperação de animais com EAE através da produção de IL-10 (FILLATREAU et al., 2002). Portanto, a utilização de componentes capazes de induzir a presença de um perfil regulatório pode ser de grande relevância para o tratamento da EAE.

Assim, avaliamos a influência de infecção com *B.abortus* no curso da EAE. De forma inesperada, os resultados demonstram um aumento na pontuação do escore clínico dos animais com EAE infectados com *B.abortus* após o 20º dia pós-indução (**Figura 14**). Este agravamento do quadro clínico provavelmente foi resultado do aumento da inflamação ocasionado pela infecção com o patógeno, visto que, apesar da *B. abortus* induzir um perfil imunossupressor, ela também induz uma forte resposta T_H1, com a presença de diversas citocinas pró-inflamatórias

como o IFN- γ e o TNF- α (OLIVEIRA et al., 1998; MURPHY et al., 2001) o que provavelmente contribuiu para potencializar o perfil inflamatório já presente na EAE. A comparação entre o perfil de citocinas presentes nos tecidos neurais (cérebro e medula óssea) de animais submetidos a EAE infectados ou não com *B. abortus*, poderia esclarecer este ponto.

A utilização de patógenos na recuperação de algumas doenças já vem sendo pesquisada devido a capacidade destes em induzir determinadas respostas no sistema imune. Já foi relatado que, a exposição de camundongos ao *Schistosoma mansoni*, por exemplo, é capaz de prevenir o desenvolvimento de diabetes tipo 1 em camundongos NOD (camundongos diabéticos não obesos) e em um modelo murino de colite experimental (ELLIOTT et al., 2003), pois promovem uma forte resposta T_H2, que inibem as respostas do tipo T_H1. Assim, a exposição a parasitos helmintos podem prevenir o desenvolvimento de respostas T_H1 excessivas (ELLIOTT et al., 2000). Além disso, o uso de pequenas moléculas microbianas com função terapêutica também tem sido relatado, onde a utilização de filamentos de hemaglutinina de *Bordetella pertussis*, uma bactéria gram-negativa, se mostrou eficiente no tratamento da colite experimental, por induzir a supressão do perfil T_H1 e de citocinas pró-inflamatórias e induzir a presença de citocinas anti-inflamatórias (BRAAT et al., 2007).

Esses estudos mostram que alguns organismos infecciosos podem contribuir para a proteção de outras doenças devido ao tipo de resposta imune que é desenvolvida na presença destes, o que não foi observado inicialmente neste estudo no uso de *B.abortus* como tratamento para EAE.

No entanto, faz-se necessário salientar que a utilização de *B.abortus* como tratamento para EAE não foi relatada antes por nenhum outro trabalho, e em função disto, os protocolos de infecção e tratamento foram definidos com base em outros parâmetros encontrados na literatura, tais como o pico da doença e o tempo que a bactéria levaria para iniciar a produção de componentes imunossupressores, dados já relatados anteriormente neste trabalho. Logo, a infecção ou o tratamento realizado uma semana antes do pico da EAE pode não ter sido suficiente para induzir a produção de componentes imunossupressores capazes de promover uma melhora significativa da doença. Apesar da diminuição na proliferação celular e aumento da produção de IL-10 ter sido observado já na primeira semana após a infecção com *B.abortus*, o aumento significativo de células T e B regulatórias ocorreu somente na

terceira semana após a infecção, quando os animais com EAE já haviam sido sacrificados. Assim, novos experimentos utilizando diferentes formas de intervenção deverão ser testados antes de descartar completamente a influência desta infecção sobre a EAE. Ademais, diversos outros componentes imunorregulatórios presentes na resposta imune contra a *Brucella*, bem como os mecanismos pelos quais o patógeno é capaz de induzi-los ainda precisam ser esclarecidos e fazem parte das perspectivas futuras deste trabalho.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que a infecção por *Brucella abortus* é capaz de induzir uma imunossupressão caracterizada pela diminuição na proliferação de linfócitos T CD8⁺ e NK, elevada produção de células B produtoras de IL-10 e aumento na população de células T CD4⁺ e T CD8⁺ com perfil regulatório. Apesar disso, mais estudos se fazem necessários para embasar a utilização deste patógeno, ou de seus componentes, no tratamento de doenças com forte perfil inflamatório.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a produção da citocina IL-6 e TGF- β , uma vez que a presença de ambas as citocinas estão envolvidas na indução de um perfil regulatório.
- Avaliar a produção de citocinas (IL-10 e TGF- β) por células da imunidade inata (macrófagos e células dendríticas).
- Avaliar o percentual de células CD39⁺, uma vez que a presença desse marcador vem sendo relacionada com a mediação de imunossupressão;
- Avaliar a expressão de outros marcadores relacionados a imunossupressão, tais como CTLA-4, LAG-3 e LAP.
- Avaliar diferentes protocolos de intervenção com *Brucella* em animais submetidos ao modelo de Esclerose Múltipla.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBULUT, H.; ILHAN, F.; CELIK, I.; OZDEN, M.; GÖDEKMERDAN, A. 2007. The Role of NK and NKT Cells in Patients with Acute Brucellosis. **Journal of clinical and diagnostic research**, **1(4)**: 243-247.

ALMEIDA, L.A.; MACEDO, G.C.; MARINHO, F.A.V.; GOMES, M.T.R.; CORSETTI, P.P.; SILVA, A.M.; CASSATARO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; OLIVEIRA, S.C. 2013. Toll-Like Receptor 6 Plays an Important Role in Host Innate Resistance to *Brucella abortus* Infection in Mice. **Infection and Immunity**, **81(5)**:1654-1662.

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

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.

APARICIO, E.D. 2013. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. **Revue scientifique et technique off international office of epizootics**, **32 (1)**: 43-51.

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.

ASHOUR, H.M.; NIEDERKORN, J.Y. 2006. Peripheral tolerance via the anterior chamber of the eye: role of B cells in MHC class I and II antigen presentation. **The Journal of Immunology**, **176 (10)**: 5950-5957.

AVILA-CALDERÓN, E. D.; LOPEZ-MERINO, A.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S.M.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A. 2013. A history of the development of *Brucella* Vaccines. *BioMed Research Internacional*, Article ID 74350: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/743509>

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**: 407-442.

BARRAT, F.J.; CUA, D.J.; BOONSTRA, A.; RICHARDS, D.F.; CRAIN, C.; SAVELKOUL, H.F.; DE WAAL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; HAWRYLOWICZ, C.M.; O'GARRA, A. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. **Journal Experimental Medicine**, **195 (5)**: 603-616.

BARRIONUEVO, P.; DELPINO, M.V.; POZNER, R.G.; VELÁSQUEZ, L.N.; CASSATARO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. 2013. Brucella abortus induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8+ T cell responses. **Cellular Microbiology**, **15(4)**: 487-502.

BARNES , M. J.; POWRIE, F. 2009. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis . **Immunity**, **31**: 401- 411.

BASSO, A.S; FRENKEL, D.; QUINTANA, F.J.; PINTO, F.A.C.; STOJKOVIC, S.P.; PUCKETT, L.; MONSONEGO, A.; SHIR, A.B.; ENGEL, Y.; GOZIN, M.; WEINER, H.L. 2008. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, **118 (4)**: 1532-1543.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.C.; WYNN, T.A.;SACKS, D.L. 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, **194 (10)**: 1497-1506.

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

BIRON C.A. 1999. Initial and innate responses to viral infections—pattern setting in immunity or disease. **Current Opinion in Microbiology**, **2**: 374–381.

BOEHM, U; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. et al. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**, **15**: 749-795.

BONECINI-ALMEIDA, M.G.; HO, J.L.; BOÉCHAT, N.; HUARD, R.C.; CHITALE, S.; DOO, H.; GENG, J.; REGO, L.; LAZZARINI, L.C.; KRITSKI, A.L.; JOHNSON, W.D. J.; MCCAFFREY, T.A.; SILVA, J.R. 2004. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. **Infection and Immunity**, **72**: 2628-2634.

BORGES, Q.I.; FONTES, C.J.F.; DAMAZO, A.S. 2013. Analysis of lymphocytes in patients with Plasmodium vivax malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. **Malaria Journal**, **12**: 455.

BOUAZIZ, J.D.; YANABA, K.; TEDDER, T.F. 2008. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. **Immunological Reviews**, **224**: 201–214.

BRAAT, H.; MCGUIRK, P.; TEN KATE, F.J.; HUIBREGTSE, I.; DUNNE, P.J.; HOMMES, D.W.; VAN DEVENTER, S.J.; MILLS, K.H. 2007. Prevention of experimental colitis by parenteral administration of a pathogen-derived immunomodulatory molecule. **Gut**, **56 (3)**: 351-357.

BRABLETZ, T.; PFEUFFER, I.; SCHORR, E.; SIEBELT, F.; WIRTH, T.; SERFLING, E. 1993. Transforming growth factor β and cyclosporin A inhibit the inducible activity

of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. **Molecular and Cellular Biology**, **13 (2)**: 1155-1162.

BRANDÃO, A.P.M.S.; OLIVEIRA, F.S.; CARVALHO, N.B.; VIEIRA, L.Q.; AZEVEDO, V.; MACEDO, G.C.; OLIVEIRA, S.C. 2011. Host Susceptibility to *Brucella abortus* Infection Is More Pronounced in IFN- γ knockout than IL-12/ β 2-Microglobulin Double-Deficient Mice. **Clinical and Developmental Immunology**, **2012**: 1-7.

BRASIL. 1977. Ministério da Agricultura. **Diagnóstico de saúde animal, Brasília**: 525-602.

BRASIL. 2000. Ministério da Agricultura. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, **30**: 39-50.

BRASIL. 2006. Ministério da Pecuária Agricultura e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br>). Acesso em: 29 de abril de 2014.

BRIONES, G.; INON DE IANNINO, N.; ROSET, M.; VIGLIOCCO, A.; PAULO, P.S.; UGALDE, R.A. 2001. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. **Infection and Immunity**, **69**: 4528-4535.

BUCKNER, J.H. 2010. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. **Nature reviews immunology**, **10**: 849-859.

CAMPBELL, D.J.; KOCH, M.A. 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. **Nature reviews immunology**, **11**: 119-130.

CASTRO, D. 1982. Prevalência da brucelose nas áreas trabalhadas pelo IESA em Minas Gerais - 1980. **Boletim IESA 1**: 1-12.

CASTRO, S.B.R.; JUNIOR, C.O.R.; ALVES, C.C.; DIAS, A.T.; ALVES, L.L.; MAZZOCCOLI, L.; MESQUITA, F.P.; FIGUEIREDO, N.S.V.; JULIANO, M.A.; CASTAÑÓN, M.C.M.N.; GAMEIRO, J.; ALMEIDA, M.V.; TEIXEIRA, H.C.; FERREIRA, A.P. 2012. Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment. **Internacional Immunopharmacology**, **12(2)**: 465-470.

CHEERS, C.; HO, M. 1983. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. **Journal of Reticuloendothelial Society**, **34 (4)**: 299-309.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **Journal of Experimental Medicine**, **198**: 1875-1886.

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.

CLOECKARERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O.; BOUMEDINE, K. S. 2003. Classification of *Brucella* stains isolated from marine mammals by infrequent restriction site – PCR and development of specific PCR identification tests. **Microbes and Infection, 5 (7):** 593-602.

COMPSTON, A.; COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. **Lancet, 372 (9648):** 1502-1517.

CORBEL, M.J. 1997. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases, 2 (3):** 213-221.

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

CORSETTI, P.P.; ALMEIDA, L.A.; CARVALHO, N.B.; AZEVEDO, V.; SILVA, T.M.A.; TEIXEIRA, H.C.; FARIA, A.C.; OLIVEIRA, S.C. 2013. Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. **Plos one, 8 (9):** e74729. doi:10.1371/journal.pone.0074729.

DAI, W. J.; KOHLER, G.; BROMBACHER, F. 1997. Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10 deficient mice. **Journal of Immunology, 158:** 2259-2267.

DAVIDSON, T.S.; DIPAOLO, R.J.; ANDERSSON, J.; SHEVACH, E.M. 2007. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF- β -mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. **Journal of Immunology, 178 (7):** 4022-4026.

DELVECCHIO, V.G.; KAPATRAL, V.; ELZER, P.; PATRA, G.; MUJER, C.V. 2002. The genome of *Brucella melitensis*. **Veterinary Microbiology, 90 (1-4):** 587-592.

DE PAULA, M.L.; RODRIGUES, D.H.; TEIXEIRA, H.C.; BARSANTE, M.M.; FERREIRA, A.P. 2008. Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology, 8 (9):** 1291-1297.

DIAS, A.T.; CASTRO, S.B.R.; ALVES, C.C.S.; MESQUITA, F.P.; FIGUEIREDO, N.S.V.; EVANGELISTA, M.G.; CASTAÑON, M.C.N.N.; JULIANO, M.A.; FERREIRA, A.P. 2015. Different MOG₃₅₋₅₅ concentrations induce distinguishable inflammation through early regulatory response by IL-10 and TGF- β in mice CNS despite unchanged clinical course. **Cellular Immunology, 293 (2):** 87-94.

DILILLO, D. J.; HORIKAWA, M.; TEDDER, T.F. 2011. B-lymphocyte effector functions in health and disease. **Immunologic Research, 49:** 281–292.

DOLEI, A.; GARSON, J.A.; ARRU, G.; CLERICI, M.; GERMI, R.; MARCHE, P.N.; PERRON, H. 2014. Multiple sclerosis-associated retrovirus and related human endogenous retrovirus-W in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **266(1-2)**: 87-88.

DORNAND, J.; LAFONT, V.; OLIARO, J.; TERRAZA, A.; CASTANEDA-ROLDAN, E.; LIAUTARD, J.P. 2004. Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism. **Infection and Immunity**, **72(4)**: 2303-2311.

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.

ELLIOTT, D.E.; LI, J.; BLUM, A.; METWALI, A.; QADIR, K.; URBAN, J.F. Jr.; WEINSTOCK, J.V. 2003. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, **284(3)**: G385-G391.

ELLIOTT, D.E.; URBAN, J.F.J.; ARGO, C.K; WEINSTOCK, J.V. 2000. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? **FASEB Journal**, **14**: 1848–1855.

EVANS, J. G.; CHAVEZ-RUEDA, K.A.; EDDAOUDI, A.; MEYER-BAHLBURG, A.; RAWLINGS, D.J.; EHRENSTEIN, M.R.; MAURI, C. 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. **The Journal of Immunology**, **178**: 7868–7878.

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.

FERNANDES, D.M.; BENSON, R.; BALDWIN, C.L. 1995. Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. **Infection and Immunity**, **63(10)**: 4029-4033.

FEUERER, M.; HILL, J.A.; MATHIS, D.; BENOIST, C. 2009. Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. **Nature immunology**, **10(7)**: 689-695.

FILLATREAU, S.; SWEENIE, C.H.; MCGEACHY, M.J.; GRAY, D.; ANDERTON, S.M. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. **Nature Immunology**, **3**: 944–950.

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.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O' GARRA, A. 1991^a. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal Immunology**, **147**: 3815-3822.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O'GARRA, A. 1991^b. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of Immunology**, **146 (10)**: 3444-3451.

FRANCO, M. P.; MULDER, M.; GILMAN, R. H.; SMITS, H. L. 2007. Human Brucellosis. **Lancet 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.

GARCIA-CARRILLO, C. 1987. La Brucelosis de los animales en America y su relacion con la infeccion humana. **Office International des Epizooties, Paris**: 43-70.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I .P.; JAMES, S. L.; SHER, A. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **Journal of Immunology**, **148**: 1792-1796.

GERHSHON, R.K. 1975. A disquisition on suppressor T cells. **Transplantation Reviews**, **26**: 170-185.

GILLAN, V.; LAWRENCE, R.A.; DEVANEY, E. 2005. B cells play a regulatory role in mice infected with the L3 of *Brugia pahangi*. **International Immunology**, **17**: 373-382.

GOENKA, R.; PARENT, M. A.; ELZER, P. H.; BALDWIN, C. L. 2011. B Cell–deficient Mice Display Markedly Enhanced Resistance to the Intracellular Bacterium *Brucella abortus*. **Journal Infectious Diseases**, **203 (8)**: 1136-1146.

GOLDING, B.; SCOTT, D.E.; SCHARF, O.; HUANG, L.Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection**, **3 (1)**: 43-48.

GORELIK, L.; FLAVELL, R.A. 2002. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. **Nature Reviews Immunology**, **2**: 46-53.

GOURRAUD, P.A.; HARBO, H.F.; HAUSER, S.L.; BARANZINI, S.E. 2012. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. **Immunological Reviews**, **248(1)**: 87-103.

GOVERMAN, J. 2009. Autoimmune T cell response in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, **9 (6)**: 393-407.

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.

GUIHOT, A.; BOSSI, P.; BRICAIRE, F. 2004. Bioterrorism with brucellosis. **Presse Medicale**, **33 (2)**: 119-122.

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.

HE,Y.; VEMULAPALLI, R.; ZEYTUN, A.; SCHURIG, G. G. 2001. Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. **Infection and Immunity**, **69 (9)**: 5502–5508.

HISAEDA, H.; MAEKAWA, Y.; IWAKAWA, D.; OKADA, H.; HIMENO, K.;KISHIHARA, K.; TSUKUMO, S.; YASUTOMO, K. 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nature medicine**, **10(1)**: 29-30.

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

HOJO-SOUZA, N; PEREIRA, D.; PASSOS, L.; CARDOSO, M.; TADA, M.; ZANINI, G.; BARTHOLOMEU, D.; FUJIWARA, R.; BUENO, L. 2015. Phenotypic profiling of CD8 + T cells during Plasmodium vivax blood-stage infection. **BMC Infectious Diseases**, **15(1)**: 35.

HOLMØY, T.; HESTVIK, A.L. 2008. Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **21(3)**: 271-278.

HORIKAWA, M.; WEIMER, E.T.; DILILLO, D.J.; VENTURI, G.M.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W.J.; HEISE, M.T.; TEDDER, T.F. 2013. Regulatory B Cell (B10 Cell) Expansion during *Listeria* Infection Governs Innate and Cellular Immune Responses in Mice. **Journal of Immunology**, **190 (3)**: 1158-1168.

HORT,G.M.; WEISENBURGER, J.; BORSDORF, B.; PETERS, C.; BANAI, M.; HAHN, H.; JACOB, J.; MIELKE, M. E. 2003. Delayed type hypersensitivity-associated disruption of splenic periarteriolar lymphatic sheaths coincides with temporary loss of IFN-gamma production and impaired eradication of bacteria in *Brucella abortus* infected mice. **Microbes and Infection**, **5 (2)**: 95–106.

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.

HVIID, L.; KEMP, K. 2000. What is the cause of lymphopenia in malaria? **Infection and Immunity**, **68(10)**: 6087-6089.

HVIID, L.; KURTZHALS, J.A.L.; GOKA, B.A.Q.; OLIVER-COMMEY, J.O.; NKRUMAH, F.K.; THEANDER, T.H. 1997. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. **Infection and Immunity**, **65(10)**: 4090-4093.

IMITOLA, J.; CHITNIS, T.; KHOURY, S.J. 2006. Insights into the molecular pathogenesis of progression in multiple sclerosis: potential implications for future therapies. **Archives of Neurology**, **63(1)**: 25-33.

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

JONG, M. F.; ROLAN, H. G.; TSOLIS, R. M. 2010. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: Brucella. **Cellular microbiology**, **12 (9)**: 1195-1202.

KASSA, D.; PETROS, B.; MESELE, T.; HAILU, E.; WOLDAY, D. 2006. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute Plasmodium falciparum and P. vivax malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. **Clinical and Vaccine Immunology**, **13(3)**: 376-379.

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

KAWAKAMI, N.; LASSMANN, S.; LI, Z.; ODOARDI, F., RITTER, T., ZIEMSEN. T.; KLINKERT, W.E.; ELLWART, J.W.; BRADL, M., KRIVACIC, K.; LASSMANN, H.; RANSOHOFF, R.M.; VOLK, H.D.; WEKERLE, H.; LININGTON, C.; FLÜGEL, A. 2004. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Experimental Medicine**, **199 (5)**: 185–197.

KESSEL, A.; HAJ, T.; PERI, R.; SNIR, A.; MELAMED, D.; SABO, E.; TOUBI, E. 2012. Human CD19⁺ CD25^{high} B regulatory cells suppress proliferation of CD4 T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. **Autoimmunity reviews**, **11(9)**: 670-677.

KOMIYAMA, Y.; NAKAE, S.; MATSUKI, T.; NAMBU, A.; ISHIGAME, H.; KAKUTA, S.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, **177(1)**: 566-573.

LANGRISH, C.L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHN, W.M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J.D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D.J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, **201(2)**: 233-240.

LUNA-MARTÍNEZ, J.E.; MEJÍA-TERÁN, C. 2002. Brucellosis in Mexico: current status and trend. **Veterinary Microbiology**, **90 (1–4)**: 19-30.

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.

MCFARLAND, H.F.; MARTIN, R. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature Immunology**, **8(9)**: 913-919.

MADAN, R.; DEMIRCIK, F.; SURIANARAYANAN, S.; ALLEN, J.L.; DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A.; YOGEV, N.; GU, Y.; KHODOUN, M.; HILDEMAN, D.; BOESPFLUG, N.; FOGOLIN, M.B.; GRÖBE, L.; GREWELING, M.; FINKELMAN, F.D.; CARDIN, R.; MOHRS, M.; MÜLLER, W.; WAISMAN, A.; ROERS, A.; KARP, C.L. 2009. Nonredundant roles for B cell-derived IL-10 in immune counter-regulation. **Journal of Immunology**, **183 (4)**: 2312-2320.

MALOY, K.J.; POWRIE, F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature immunology**, **2 (9)**: 816-822.

MANGAN, N. E.; FALLON, R.E.; SMITH, P.; VAN ROOIJEN, N.; MCKENZIE, A.N.; FALLON, P.G. 2004. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. **Journal of Immunology**, **173**: 6346–6356.

MANN, M.K.; MARESZ, K.; SHRIVER, L.P.; TAN, Y.; DITTEL, B.N. 2007. B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, **178 (6)**: 3447-3456.

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

MARIA, P.F.; MAXIMILLAN, M.; ROBERT, H.G.; HENK, L.S. 2007. Human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, **7**: 775-86.

MATSUSHITA, T.; HORIKAWA, M.; IWATA, Y.; TEDDER, T.F. 2010. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling EAE initiation and late-phase immunopathogenesis. **Journal of Immunology**, **185**: 2240-2252.

MATSUSHITA, T.; YANABA, K.; BOUAZIZ, J.D.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T.D. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **Journal of Clinical Investigation**, **118**: 3420-3430.

MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. 2008. The ‘short’ history of regulatory B cells. **TRENDS in Immunology**, **29 (1)**: 34-40.

MAURI, C.; GRAY, D.; MUSHTAQ, N.; LONDEI, M. 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. **Journal of Experimental Medicine**, **197**: 489–501.

- 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.
- MIZOGUCHI, A.; BHAN, A.K. 2006. A case for Regulatory B cells. **Journal of Immunology**, **176**: 705-710.
- MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A.; PREFFER, F.I.; BHAN, A.K. 2000. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. **International Immunology**, **12**: 597–605.
- 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.
- MOTTET, C.; UHLIG, H.H.; POWRIE, F. 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. **Journal of Immunology**, **170 (8)**: 3939-3943.
- MURAI, M.; TUROVSKAYA, O.; KIM, G.; MADAN, R.; KARP, C.L.; CHEROUTRE, H.; KRONENBERG, M. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis . **Nature Immunology**, **10(11)**: 1178-1184.
- MURPHY, E. A.; SATHIYASEELAN, J.; PARENT, M. A.; ZOU, B.; BALDWIN, C. L. 2001. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. **Immunology**, **103 (4)**: 511–518.
- MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.L. 2002. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infection and Immunity**, **70 (11)**: 6284-6293.
- NEVES, P.; LAMPROPOULOU, V.; CALDERON-GOMEZ, E.; ROCH, T.; STERVBO, U.; SHEN, P.; KÜHL, A.A.; LODDENKEMPER, C.; HAURY, M.; NEDOSPASOV, S.A.; KAUFMANN, S.H.; STEINHOFF, U.; CALADO, D.P.; FILLATREAU, S. 2010. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella typhimurium infection. **Immunity** **33 (5)**: 777-790.
- OCAÑA-MORGNER, C.; MOTA, M.M.; RODRIGUEZ, A. 2003. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, **197(2)**: 143–51.
- OLIVEIRA, S.C.; HARMS, J.S.; RECH,E.L.;RODARTE,R.S.; BOCCA, A.L.;GOES, A.M.; SPLITTER, G.A. 1998. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. **Brazilian journal of medical and Biological Research**, **31**: 77-84.

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 1 CD44hi CD45Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. **European Journal of Immunology**, **25**: 2551–2557.

O'NEILL, L. A. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. **Current Opinion in Immunology**, **18**: 3 - 9.

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

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

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

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

PASQUALI, P.; THORNTON, A.M.; VENDETTI, S.; PISTOIA, C.; PETRUCCI, P.; TARANTINO, M.; PESCIAROLI, M.; RUGGERI, F.; BATTISTONI, A.; SHEVACH, E.M. 2010. CD4+CD25+ T regulatory cells limit effector T cells and factor the progression of brucellosis in BALB/c mice. **Microbes and infection**, **12**: 3-10.

PAULSEN, .IT.; SESHADRI, R.; NELSON, K.E.; EISEN J.A.; HEIDELBERG, J.F.; READ, T.D.; DODSON, R.J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L.M.; BEANAN, M.J.; DAUGHERTY, S.C.; DEBOY, R.T.; DURKIN, A.S.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; NELSON, W.C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S.E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S.R.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; HOOVER, D.L.; LINDLER, L.E.; HALLIN, S.M.; BOYLE, S.M.; FRASER, C.M. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **99 (20)**: 13148-13153.

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

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. 2002. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, **90 (1-4)**: 55-62.

QUEIROZ, M.C. Efeito do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a bactéria *Brucella abortus*. Juiz de Fora (MG), 2013. Dissertação de mestrado (Curso

de pós-graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

REDPATH, S.; GHAZAL, P.; GASCOIGNE, N. R. 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens . **Trends in Microbiology**, **9**: 86-92.

REICHARDT, P.; DORNBACH, B.; RONG, S.; BEISSERT, S.; GUELER, F.; LOSER, K.; GUNZER, M. 2007. Naive B-cells generate regulatory T-cells in the presence of a mature immunological synapse. **Blood**, **110 (5)**: 1519-1529.

RICCIO, E.K.P.; JÚNIOR, I.N.; RICCIO, L.R.; DAS GRAÇAS ALECRIM, M.; CORTE-REAL, S.; MORGADO, M.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; DE FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ, M. 2003. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. **Parasitology Research**, **90(1)**: 9–18.

RONET, C.; HAUYON-LA TORRE, Y.; REVAZ-BRETON, M.; MASTELIC, B.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J.; LAUNOIS, P. 2010. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. **The Journal of Immunology**, **184 (2)**: 886–894.

ROOP, R. M.; BELLAIRE, B.H.; VALDERAS, M.W.; CARDELLI, J.A. 2004. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. **Molecular Microbiology**, **52 (3)**: 621-630.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, **133 (5)**: 775–787.

SALMERÓN, I.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, M.; SALMERÓN, O.; MANZANO, L.; VAQUER, S.; ALVAREZ-MON, M. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. **Clinical infectious Disease**, **15(5)**: 764-770.

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

SARAIVA, M.; O' GARRA, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells . **Nature Reviews Immunology**, **10**: 170-181.

SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; TIAN, J.; GRANT, E. P.; PASPARAKIS, M.; MAEHR, R.; OVAA, H.; PLOEGH, H.L.; COYLE, A.J.; RAJEWSKY, K. 2004. Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-κB activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101 (13)**: 4566-4571.

SCOTT-BROWNE , J. P.; SHAFIANI, S.; TUCKER-HEARD, G.; ISHIDA-TSUBOTA, K.; FONTENOT, J.D.; RUDENSKY, A.Y.; BEVAN, M.J.; URDAHL, K.B. 2007. Expansion and function of Foxp3 - expressing T regulatory cells during tuberculosis. **Journal of Experimental Medicine**, **204 (9)**: 2159-2169.

SELLON, R.K.; TONKONOGY, S.; SCHULTZ, M.; DIELEMAN, L.A.; GRENTHER, W.; BALISH, E.; RENNICK, D.M.; SARTOR, R.B. 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infection and Immunity**, **66 (11)**: 5224-5231.

SHAFIANI, S.; TUCKER-HEARD, G.; KARIYONE, A.; TAKATSU, K.; URDAHL, K. B. 2010. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. **Journal of Experimental Medicine**, **207**: 1409-1420.

SINDHAVA, V.; WOODMAN, M.E.; STEVENSON, B.; BONDADA, S. 2010. Interleukin-10 mediated autoregulation of murine B-1 B-cells and its role in *Borrelia hermsii* infection. **Plos One**, **5 (7)**: e11445.

SPERA, J.M.; UGALDE, J.E.; MUCCI, J.; COMERCI, D.J.; UGALDE, R.A. 2006. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103 (44)**: 16514-16519.

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.

SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S.; CAREY, M.; MILLER, C.; KO, J.; COVERT, J. 1996. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. **Veterinary Immunology Immunopathology**, **54 (1-4)**: 309-319.

STEINMAN, L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, **13(2)**: 139-145.

TAYLOR, M.D.; LEGOFF, L.; HARRIS, A.; MALONE, E.; ALLEN, J.E.; MAIZELS, R.M. 2005. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance *in vivo*. **The Journal of Immunology**, **174**: 4924-4933.

TOURÉ-BALDÉ, A.; SARTHOU, J.L.; ROUSSILHON, C. 1995. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. **Immunology Letters**, **46 (1-2)**: 59-62.

TSITOURA, D.C.; YEUNG, V.P.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. 2002. Critical role of B cells in the development of T cell tolerance to aeroallergens. **International Immunology**, **14**: 659–667.

VENKEN, K.; HELLINGS, N.; THEWISSEN, M.; SOMERS, V.; HENSEN, K.; RUMMENS, J.L.; MEDAER, R.; HUPPERTS, R.; STINISSEN, P. 2008. Compromised CD4⁺ CD25^(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. **Immunology**, **123(1)**: 79-89.

- VIGLIETTA, V.; BAECHER-ALLAN, C.; WEINER, H.L.; HAFNER, D.A. 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, **199(7)**: 971–979.
- VIVIER, E.; TOMASELLO, E.; BARATIN, M.; WALZER, T.; UGOLINI, S. 2008. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, **9 (5)**: 503-510.
- WAGNER, R. D.; MAROUSHEK, N. M.; BROWN, J. F.; CZUPRYNSKI, C. J. 1994. Treatment with anti-interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance to but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infection and Immunity**, **62**: 2345-2353.
- WALTHER, M.; TONGREN, J.E.; ANDREWS, L.; KORBEL, D.; KING, E.; FLETCHER, H.; ANDERSEN, R.F.; BEJON, P.; THOMPSON, F.; DUNACHIE, S.J.; EDELE, F.; DE SOUZA, J.B.; SINDEN, R.E.; GILBERT, S.C.; RILEY, E.M.; HILL, A. V. 2005. Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. **Immunity**, **23 (3)**: 287-296.
- WEI, B.; VELAZQUEZ, P.; TUROVSKAYA, O.; SPRICHER, K.; ARANDA, R.; KRONENBERG, M.; BIRNBAUMER, L.; BRAUN, J. 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4⁺ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **102 (6)**: 2010-2015.
- WEST, A. P.; KOBLANSKY, A.A.; GHOSH, S. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, **22**: 409–437.
- WOLF, S.D.; DITTEL, B.N.; HARDARDOTTIR, F.; JANEWAY, C.A. J. 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, **184 (6)**: 2271–2278.
- YAMAGIWA, S.; GRAY, J.D.; HASHIMOTO, S.; HORWITZ, D.A. 2001. A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. **Journal of Immunology**, **166**: 7282-7289.
- YANABA, K.; BOUAZIZ, J.D.; HAAS, K.M.; POE, J.C.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T.F. 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. **Immunity**, **28 (5)**: 639–650.
- YIN, J.X.; TU, J.L.; LIN, H.J.; SHI, F.D.; LIU, R.L.; ZHAO, C.B.; STEPHEN, W.C.; KUNIYOSHI, S.; SHI, J. 2010. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model. **Plos One**, **5 (8)**: 1-14.
- YINGST, S.; HOOVER, D.L. 2003. T cell immunity to brucellosis. **Critical Reviews in Microbiology**, **29**: 313-331.
- YOUNG, E. J. 1983. Human Brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, **5 (5)**: 821-842.

ZOU, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nature reviews immunology**, **6**: 295-307.