

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Papel do sistema de secreção tipo IV (SST4) na
internalização e sobrevivência de *Brucella*, lisa e
rugosa: infecção *in vitro* e *in vivo***

Joicy Cortez de Sá

São Luís – MA
2011

Joicy Cortez de Sá

Papel do sistema de secreção tipo IV (SST4) na internalização e sobrevivência de *Brucella*, lisa e rugosa: infecção *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta - UEMA

Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiane Alves da Paixão - UFMG

São Luís – MA
2011

Sá, Joicy Cortez de.

Papel do sistema de secreção tipo IV (SST4) na internalização e sobrevivência de *Brucella*, lisa e rugosa: infecção *in vitro* e *in vivo* / Joicy Cortez de Sá.– São Luís, 2011.

94 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2011.

Orientador: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta

1.*Brucella* sp. 2.Fator de virulência virB. 3.Macrófagos Raw 264.7. 4.Camundongos Balb/c. I.Título

CDU: 616.993

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 03 de março de 2011, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

1º Membro

Prof. Dr. Renato de Lima Santos - UFMG

2º Membro

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva - UEMA

3º Membro

**Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta - UEMA
(Orientadora)**

“Até aqui me ajudou o Senhor”

(Samuel: 7, 12)

“A melhor de todas as coisas é aprender.

O dinheiro pode ser perdido ou roubado,

a saúde e força podem falhar,

mas o que você dedicou à sua mente

é seu para sempre”.

(Louis L. Amour)

*Aos meus amados Pais, **Julimar e Isabel**, pelos ensinamentos
de vida e pela imensa dedicação na minha educação.*

*Ao meu esposo, **Armstrong**, pelo carinho e compreensão
durante todos esses anos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Julimar e Isabel, pelos esforços declinados na minha educação, pelo carinho e exemplo de força de vontade, que me encoraja ir mais além.

Aos meus amados irmãos Ilany, Thiago e Hiago, pelas inesperadas ligações, pois mesmo distante me fazem sentir perto de casa.

Ao meu marido, Armstrong, um grande companheiro, que apóia e incentiva meus sonhos.

À minha sogra que me acolheu ao chegar a São Luís, no começo de uma nova vida.

À Profa. Alcina, que mesmo sem me conhecer aceitou orientar-me nesta jornada, criando oportunidades para meu crescimento profissional.

Aos Professores do Mestrado em Ciência Animal-UEMA, pelos ensinamentos e receptividade de uma maranhense paraense.

Aos Professores da Escola de Veterinária da UFMG, em especial, ao Prof. Renato, por abrir as portas do Laboratório de Patologia Molecular, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho, bem como, pela formação crítica que adquiri durante o convívio de seis meses. Um exemplo de pesquisador.

À Profa Tatiane, pela paciência e dedicação ao me ensinar, que me acalmava durante as angústias dos experimentos.

À CAPES e a FAPEMA pela concessão da bolsa.

Aos amigos mineirinhos, Teane, Silvia, Érika, Valéria, Adriana, Ana Patrícia, Auricélio, Luciana, Juliana Paniago, Taismara, Roberta, Ana Luiza, Juliana Mol, Telma,..... pelo carinho com que me acolheram no Laboratório e pelo companherismo durante horas no nível 3..... vocês foram essenciais para a realização deste trabalho e sempre muito solícitos .

Às amigas Karine e Mariana, pelos domingos em família na terra Mineira.

Aos amigos do mestrado /2009, pelo carinho e apoio durante esta jornada de 2 anos, em especial a Andréia, Érico, Fernando, Herlon, Júlia, Lidiane, Lucélia e Ylisieux.

Às amigas Carol Ericeira e Solange, que me fizeram gostar de biologia molecular e com paciência me ensinaram os primeiros passos.

Ao grupo do Laboratório de Patologia molecular e Anatomopatologia – UEMA, Nayanna, Odinéa, Larissa, Arlene, Vênir, Renata, Gabriel.....

Às secretarias do mestrado, Carol Romão e Laudicéia, pela paciência.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

Meu sincero obrigada!

SÁ, J. C. **Papel do sistema de secreção tipo IV (SST4) na internalização e sobrevivência de *Brucella*, lisa e rugosa: infecção *in vitro* e *in vivo*.** [Role of type IV secretion system (T4SS) on internalization and survival of *Brucella*, smooth and rough strain: infection *in vitro* and *in vivo*]. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

RESUMO

O gênero *Brucella*, corresponde um grupo de patógenos bacterianos, intracelulares, causadores de infecção crônica. Um fator de virulência essencial para o estabelecimento desta infecção é o sistema de secreção tipo IV (SST4), codificado pelo operon *virB*. Outro fator relacionado à virulência corresponde o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa, apresentando o gênero *Brucella* dois tipos, LPS liso e rugoso. Diante disto e, visando uma melhor compreensão da patogênese da cepa rugosa, *Brucella ovis*, devido à escassez de dados, o presente trabalho objetivou avaliar o papel do SST4 na internalização e sobrevivência das cepas de *Brucella*, lisa e rugosa. Foram realizadas infecções *in vitro* (macrófagos murino - Raw 264.7, com 5×10^7 UFC/ml) e *in vivo* (camundongos Balb/c, infecção intraperitoneal, com 1×10^6 UFC/ml), com amostras de *B. ovis*, $\Delta virB$ *B. ovis*, RB51 e $\Delta virB$ RB51 (LPS rugoso) e *Brucella abortus* e $\Delta virB$ *B. abortus* (LPS liso). Adicionalmente foram efetuadas, análises bacteriológicas, histológicas, imunohistoquímicas e expressão gênica (RT-PCRq) de determinadas citocinas/quimiocinas (MIP-2, MIP-1 β , KC, IL-6 e IL-10). O SST4 é importante para a replicação intracelular de amostras rugosas de *Brucella*, demonstrando *in vitro*, papel semelhante ao observado em amostras de LPS liso, como a *B. abortus*. O processo de internalização não é influenciado pelo operon *virB* nas amostras lisa e rugosa. Mutantes $\Delta virB$ *B. ovis* são incapazes de sobreviver e multiplicar em macrófagos peritoneais, apresentando baixa colonização esplênica e menor patogenicidade que a amostra parental, estando atenuado 1 dia pós-infecção (p.i.) em camundongos Balb/c. *B. abortus* e $\Delta virB$ *B. abortus* possuem semelhante cinética de infecção *in vivo* nas primeiras 24h. A *B. ovis* não causa inflamação em baço e fígado de camundongos no início da infecção, demonstrando baixos níveis de expressão de MIP-2, MIP-1 β , KC, IL-6 e IL-10, 24h após a infecção. Estes resultados indicam que o SST4 é fundamental para sobrevivência e replicação intracelular de amostras lisa e rugosa de *Brucella*.

Palavras-chave: *Brucella* sp.; fator de virulência *virB*; macrófagos Raw 264.7; camundongos Balb/c

SÁ, J. C. **Role of type IV secretion system (T4SS) on internalization and survival of *Brucella*, smooth and rough strain: infection *in vitro* and *in vivo*.** [Papel do sistema de secreção tipo IV (SST4) na internalização e sobrevivência de *Brucella*, lisa e rugosa: infecção *in vitro* e *in vivo*]. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

ABSTRACT

The genus *Brucella*, represents a group of bacterial pathogens, intracellular, causing chronic infection. A virulence factor essential for the establishment of this infection is type IV secretion system (T4SS), encoded by the *virB* operon. Another factor related to virulence corresponds to the formation of lipopolysaccharide (LPS) outer membrane, with the genus *Brucella* two types, smooth and rough LPS. To understand the pathogenesis of rough strain, *Brucella ovis*, due to lack of data, this study aimed to evaluate the role of T4SS in internalization and survival of strains of *Brucella*, smooth and rough. Infections were performed *in vitro* (murine macrophages - Raw 264.7, with 5×10^7 CFU/ml) and *in vivo* (BALB/c mice, infected intraperitoneally with 1×10^6 CFU/ml), with samples of *B. ovis*, $\Delta virB$ *B. ovis*, RB51 and $\Delta virB$ RB51 (rough LPS) and *Brucella abortus* and $\Delta virB$ *B. abortus* (LPS smooth). Additionally, it was made, bacteriological, histological, immunohistochemical technicals and gene expression analysis (qRT-PCR) of certain cytokines/chemokines (MIP-2, MIP-1 β , KC, IL-6 and IL-10). It was found that the T4SS is important for intracellular replication of strains of rough *Brucella*, demonstrating *in vitro*, a similar role to that observed in samples of LPS smooth, like *B. abortus*. The internalization process is not influenced by the *virB* operon in smooth and rough samples. $\Delta virB$ *B. ovis* mutants are unable to survive and multiply in macrophages, with low spleen colonization and less pathogenicity than the parental sample, attenuated 1 day after infection in Balb/c mice. *B. abortus* and *B. $\Delta virB$ abortus* have similar kinetics of infection *in vivo*. *B. ovis* does not cause inflammation in the spleen and liver of mice in the early 24 hours after infection, resulting low levels of expression of MIP-2, MIP-1 β , KC, IL-6 and IL-10. These results indicate that T4SS is essential for intracellular survival and replication of strains smooth and rough *Brucella*.

Keywords: *Brucella* sp.; virulence factor *virB*; Raw 264.7 macrophages; Balb/c mice.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura.....	18
1 HISTÓRICO.....	18
2 O GÊNERO <i>Brucella</i>	20
3 BRUCELOSE EM OVINOS E BOVINOS.....	23
4 PATOGÊNESE.....	25
5 O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO IV (SST4).....	28
6 TRÁFEGO INTRACELULAR.....	30
7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO.....	33
7.1 RESPOSTA IMUNE INATA.....	34
7.2 RESPOSTA IMUNE ADQUIRIDA.....	38
.	.
CAPÍTULO 2: Cinética de infecção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> – <i>Brucella</i>, lisa e rugosa.....	41
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
1.1 AMOSTRAS BACTERIANAS, LINHAGEM CELULAR E CAMUNDONGOS.....	42
1.2 MUTAGÊNESE.....	43
1.2.1 Construção do plasmídeo.....	43
1.2.2 Eletroporação.....	43
1.2.3 Confirmação da mutação por PCR convencional.....	44
1.3 CULTIVO CELULAR.....	46
1.4 CURVA DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO Brucella ovis</i>	47
1.5 INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	47
1.5.1 Preparo do inóculo.....	47
1.5.2 Infecção.....	48
1.6 INFECÇÃO <i>IN VIVO</i>	49
1.6.1 Infecção.....	49
1.6.2 Recuperação de macrófagos peritoneais e coleta de órgãos.....	50
1.6.3 Bacteriologia.....	51
1.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51

2 RESULTADOS.....	52
2.1 MUTAGÊNESE - $\Delta virB2$ RB51.....	52
2.2 CURVA DE CRESCIMENTO.....	54
2.3 CINÉTICA DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	55
2.4 CINÉTICA DE INFECÇÃO <i>IN VIVO</i>	58
3 DISCUSSÃO.....	62
 CAPÍTULO 3: Resposta imunológica inicial à infecção por <i>Brucella</i>.....	 68
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
1.1 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	69
1.2 EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL....	70
1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
2 RESULTADOS.....	72
2.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	72
2.2 EXPRESSÃO GÊNICA.....	74
3 DISCUSSÃO.....	75
 CONCLUSÕES.....	 79
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Iniciadores utilizados para PCR convencional.....	46
Tabela 2.	Genes e iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real....	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A:** Confirmação da mutagênese $\Delta virB2$ RB51. Realização de 53
PCR convencional utilizando iniciadores específicos para o operon *virB*; 1, 2 e 3 – amostras selvagens de *B. abortus* RB51, com amplificação de um produto de 734 pb, referente ao operon analisado; 4 – mutante $\Delta virB2$ RB51, tendo um produto amplificado maior, com 1521 pb, devido a inserção do cassete de canamicina.
- B:** PCR convencional, com iniciadores específicos para o gene *bcsp31*, que é conservado nas espécies do gênero *Brucella*; 1, 2 e 3 – amostras *B. abortus* RB51 e 4 - $\Delta virB2$ RB51, todas com amplificação de um produto de 223 pb, referente ao gene analisado.
- Figura 2.** PCR multiplex AMOS-ENHANCED. Seis amostras de 53
referência do gênero *Brucella* foram utilizadas como controle positivo: Ba, *B. abortus* 544 (498 pb e 178 pb); Bm, *B. melitensis* 16M (731 pb e 178 pb); Bo, *B. ovis* reo 198 (976 pb, 364 pb e 178 pb); Bs, *B. suis* (285 pb e 178 pb); RB, amostra vacinal RB51 (498 pb, 364 pb e 178 pb) e B19, amostra vacinal B19 (498 pb). 1 e 2 correspondem às amostras analisadas; 1 – amostra parental de *B. abortus* RB51 utilizada na mutagênese; 2 - amostra mutante $\Delta virB2$ RB51, ambas com amplificadas semelhantes a amostra vacinal RB51 (498 pb, 364 pb e 178 pb).
- Figura 3.** Curva de crescimento *in vitro* da amostra parental *Brucella* 55
ovis e mutante $\Delta virB$ *B. ovis*, em meio TSA suplementado com 1% de hemoglobina, incubadas à 37°C com 5% CO₂. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica, representando à média e desvio padrão de triplicatas por cada tempo analisado.
- Figura 4.** Cinética de infecção *in vitro* em macrófagos Raw 264.7, nos 56
tempos de 0, 4, 24 e 48 h pós-infecção, fazendo um comparativo entre amostras parentais: *B. ovis* (A), *B. abortus* (B) e *B. abortus* RB51 (C) e as mutantes *virB* correspondentes. Contagens de UFC foram submetidas à transformação logarítmica, representando à média e desvio padrão de triplicatas em cada tempo. Os dados são referentes a um experimento, sendo representativo de no mínimo três experimentos independentes sob as mesmas condições. A diferença estatística entre as amostras está indicada por asterisco (**p<0,01; ***p<0,001).

- Figura 5.** Cinética de infecção *in vivo* em camundongos Balb/c, com 59
inoculação de aproximadamente 1×10^6 UFC/animal da
amostra selvagem *B. ovis* e mutante $\Delta virB$ *B. ovis*, por via
intraperitoneal. A capacidade de sobrevivência extracelular
(A), replicação intracelular nos macrófagos peritoneais (B) e
colonização esplênica (C) foram avaliadas nos tempos de 6,
12 e 24 h pós-infecção. A contagem de UFC foi submetida à
transformação logarítmica, representando à média e desvio
padrão de grupos de camundongos (n=4). Diferença
significativa entre as amostras está indicada pelos asteriscos
(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).
- Figura 6.** Cinética de infecção *in vivo*, com amostra parental de *B.* 61
abortus e mutante $\Delta virB$ *B. abortus*, em camundongos
Balb/c, via inoculação intraperitoneal de aproximadamente 1
 $\times 10^6$ UFC/animal. A capacidade de sobrevivência
extracelular (A), replicação intracelular nos macrófagos
peritoneais (B) e colonização esplênica (C) foram avaliadas
nos tempos de 6, 12 e 24 h pós-infecção. A contagem de
UFC foi submetida à transformação logarítmica,
representando à média e desvio padrão de grupos de
camundongos (n=4).
- Figura 7.** Fotomicrografia de fígado (A) e baço (B) de camundongos 73
Balb/c, infectados por 24h, com cepas de *Brucella ovis*, 1×10^6
UFC/animal. Ausência de alterações histológicas
significativas (HE).
- Figura 8.** Expressão de RNAm de quimiocinas (MIP-2, MIP-1 β e KC) e 75
citocinas (IL-6 e IL-10), no baço de camundongos Balb/c, 24
h pós-infecção por *Brucella* spp., através RT-PCR em tempo
real. Resultados provenientes da comparação com o grupo
controle, correspondente a animais não infectados (n=4),
estando os dados representados por média geométrica e erro
padrão. A diferença significativa entre os grupos está
indicada por letras distintas (p<0,05).
-

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	Antes de Cristo
AD	<i>Anno Domini</i>
BCV	<i>Brucella – containing vacuole</i>
Btp1	<i>Brucella Tir protein 1</i>
CBGs	<i>Cyclic b-1,2-glucans</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
C1q	Fator de complemento (opsoninas)
C3b	Fator de complemento (opsoninas)
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EC	Extracelular
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
ERES	<i>Endoplasmic Reticulum Exit Sites</i>
FC	<i>Fragment Crystallizable</i>
GAPDH	Gliceraldeído Fosfato Dehidrogenase
GC	Guanina/Citosina
GM ₁	<i>Monosialotetrahexosylganglioside</i>
GMP	<i>Guanosine Monophosphate</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HE	Hematoxilina/Eosina
HKBA	<i>Heat-Killed Brucella abortus</i>
IC	Intracelular
IFN-	Interferon
IgG-	Imunoglobulina G
IL-	Interleucina
Inos	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i>
KC	<i>Keratinocyte Chemoattractant</i>
LAMP-1	<i>Lysosomal associated membrane glycoprotein-1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response gene (88)</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase</i>
NF-Kb	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> (favorecedor de células B ativadas)

NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NOD	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain</i>
OD	<i>Optical Density</i>
OMPs	<i>Outer Membrane Protein</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
Pb	<i>Pares de base</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	<i>Protein Disulfide Isomerase</i>
p.i.	<i>Pós-infecção</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinases</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RE	<i>Retículo endoplasmático</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROI	<i>Reactive Oxygen Intermediate</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
SST4	<i>Sistema de Secreção do Tipo IV</i>
SR-A	<i>Scavenger receptor</i>
TcpB	<i>TIR-domain Containing Protein of Brucella</i>
Th-	<i>T helper cells</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1 Receptor</i>
TIRAP	<i>Toll-Interleukin 1 Receptor Adaptor Protein</i>
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor – alpha</i>
TRAM	<i>TRIF-related Adaptor Molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon-β</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	<i>Unidades Formadoras de Colônia</i>

INTRODUÇÃO

O gênero *Brucella* corresponde um grupo de patógenos bacterianos, cocobacilos, gram-negativo, intracelular facultativo, pertencente à família alphaproteobacteria (GARRITY, 2001), sendo capaz de acometer diversos mamíferos, dentre eles, ovinos, bovinos, caprinos, suínos, cães, animais marinhos e o próprio homem (CORBEL, 2006). Estas bactérias são agentes etiológicos da brucelose, uma enfermidade zoonótica de distribuição mundial, que ocasiona grande impacto econômico e na saúde pública (BRASIL, 2006).

Inicialmente foram descritas seis espécies: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* e *Brucella neotomae*, sendo a classificação baseada principalmente em diferenças de patogenicidade, preferência de hospedeiro e características fenotípicas (ALTON et al., 1988). Por exemplo, a *B. ovis* acomete preferencialmente ovinos e a *B. abortus* bovinos (PAULIN, 2003).

Nos últimos anos, espécies adicionais foram incluídas no gênero, dentre elas: duas espécies isoladas em animais marinhos, *Brucella pinnipedialis* e *Brucella ceti* (FOSTER et al., 2002); uma isolada no *Microtus arvalis*, um rato silvestre, denominada *Brucella microti* (SCHOLZ et al., 2008); outra espécie, *Brucella inopinata*, isolada de implante mamário em uma mulher e após em um paciente de 52 anos na Austrália, com uma história clínica de pneumonia destrutiva crônica (DE et al., 2008; SCHOLZ et al., 2009; TILLER et al., 2010); e mais recentemente uma nova espécie ainda não classificada, isolada no útero de babuínos, associada a aborto (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009).

A brucelose é uma infecção crônica, sendo usualmente adquirida por inalação ou ingestão da bactéria que após penetrar no hospedeiro, através da mucosa epitelial é transportada livre ou dentro de células fagocíticas, para os linfonodos regionais, fígado, baço, medula óssea, glândula mamária e órgãos sexuais, onde ela expressa sua patogenicidade (CORBEL, 1997).

Os fatores envolvidos com a patogenicidade do gênero *Brucella* são aqueles que permitem a invasão, a sobrevivência e a multiplicação em células

do hospedeiro, sendo estas fagocíticas ou não fagocíticas (GORVEL & MORENO, 2002).

Um fator de virulência essencial para o estabelecimento da infecção crônica é o sistema de secreção tipo IV (SST4), codificado pelo locus *virB*, um operon de 12 genes (*virB1* a *virB12*), localizado no cromossomo II (den HARTIGH et al., 2004), sendo importante na sobrevivência e replicação intracelular da *Brucella* (HONG et al., 2000). O SST4 é essencial para o escape da *Brucella* da fusão do fagossomo com o lisossomo e direcionamento para o sítio de replicação intracelular, que tem características de retículo endoplasmático (GORVEL & MORENO, 2002; CELI, 2006).

Mutantes *virB* são incapazes de persistir nas células do hospedeiro e não causam infecção crônica em camundongos (SIEIRA et al., 2000; BOSCHIROLI et al., 2002; ROUX et al., 2007; ROLAN & TSOLIS, 2007, 2008).

Adicionalmente, outros estudos têm sugerido que o SST4 da *Brucella* está envolvido na secreção de efetores, que são requeridos para o estabelecimento favorável da bactéria em compartimentos intracelulares (BOSCHIROLI et al., 2002). Além disso, o SST4 também é essencial para estimular resposta inflamatória, bem como do sistema imunológico durante infecção por *Brucella* em camundongos. Visto que, mutante *virB* de *B. abortus* é incapaz de estimular a expressão de genes pró-inflamatórios e resposta imune de interferon, tipo I e II, no baço de camundongos, diferente da amostra virulenta (ROUX et al., 2007). O SST4 é necessário para uma resposta inicial de citocinas, como a interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- γ , que contribui para a polarização da resposta imune do tipo T helper 1 (Th1) (ROLAN & TSOLIS, 2008).

Outro fator relacionado à virulência é o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa. A *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti* e *B. pinnipedialis* expressam LPS liso, que contém uma cadeia O de polissacarídeo, conectada a um oligossacarídeo central ligado ao lipídeo A. A *B. ovis* e *B. canis*, não possuem o polissacarídeo O, portanto apresentam LPS rugoso (LAPAQUE et al., 2005; ZYGMUNT et al., 2009). Amostras mutantes com LPS rugoso são menos virulentas e menos resistentes ao ataque de

complemento que suas amostras isotípicas lisas (KO & SPLITTER, 2003). A cadeia O parece ser uma molécula chave na invasão e sobrevivência intracelular (PORTE et al., 2003), pois inibe a indução a apoptose (FERNANDEZ-PRADA et al., 2003), protege também a bactéria intracelular de peptídeos catiônicos (FREER et al., 1996) e metabólitos de oxigênio das células inflamatórias (STINAVAGE et al., 1989). Contudo, amostras naturalmente rugosas, como a *B. ovis* e *B. canis* são consideradas patogênicas para seus hospedeiros preferenciais e são capazes de causar infecção crônica em modelo murino (CARO-HERNÁNDEZ et al., 2007; SILVA et al., 2011).

Vários trabalhos têm demonstrado a importância do operon *virB* para a sobrevivência e replicação intracelular das espécies patogênicas de *Brucella*, principalmente as de LPS liso como *B. abortus* (ROUX et al., 2007; ROLAN & TSOLIS, 2007, 2008) e *B. melitensis* (PAIXÃO et al., 2009a; WANG et al., 2010), visto que todas as amostras geradas a partir de mutação do operon *virB* foram atenuadas e perderam sua capacidade de replicação intracelular. Contudo, não existem trabalhos avaliando o papel do SST4 em espécies de *Brucella* naturalmente rugosas, como a *B. ovis*, justificando-se a realização deste trabalho, que auxiliará na melhor compreensão da patogênese desta espécie de *Brucella*, abordando os mecanismos relacionados à invasão e sobrevivência intracelular, bem como a resposta imunológica inicial do hospedeiro à infecção.

A presente pesquisa foi dividida em 03 capítulos para melhor disposição dos dados. O capítulo 1 é referente à revisão de literatura, os capítulos 2 e 3 abordam os objetivos, metodologias, resultados e discussões.

REVISÃO DE LITERATURA

1 HISTÓRICO

Os primeiros relatos de lesões compatíveis com àquelas causadas por *Brucella* e, conseqüentemente, a ocorrência da brucelose são muito antigos. Estudos antropológicos da cidade romana Herculano, que foi destruída por uma erupção vulcânica do Monte Vesúvio em 79 AD (*Anno Domini*), soterrando os habitantes por lama vulcânica, demonstraram em 17,4% dos vestígios ósseos desses habitantes, lesões ósseas típicas da brucelose. A maioria eram homens de 20 a 25 anos de idade e, esta alta incidência foi correlacionada com o consumo de leite e derivados lácteos de ovinos. Em concordância com esta hipótese, foi encontrado um queijo carbonizado e através da análise de microscopia eletrônica de varredura, detectaram a presença de uma variedade de bactérias, dentre elas, algumas com estruturas morfológicas e dimensão compatível com *Brucella* spp. (CAPASSO, 2002).

Segundo Pappas et al. (2006), a importância das espécies de *Brucella* foi reconhecida desde a antiguidade, onde a brucelose pode ter sido a quinta praga do Egito. Em estudos recentes, realizados pela pesquisadora Jamie Hodgkins, do Instituto Smithsonian, foi constatado sacroileíte, uma complicação comum em infecções por *Brucella*, em 5,2% dos ossos pélvicos dos antigos egípcios, pertencentes a uma era 750 a.C (antes de Cristo). Além disso, foi observada lesões osteoarticulares em vários outros fragmentos ósseos (PAPPAS & PAPADIMITRIOU, 2007).

Adicionalmente, análises paleopatológicas na África do Sul, em esqueletos de homínídeos, *Australopithecus africanus*, demonstraram a presença de lesões na coluna vertebral, diagnosticada como espondilose deformante. Baseado nos aspectos macroscópicos, microscópicos e radiológicos, estas lesões líticas na coluna foram consideradas condizentes com brucelose (D'ANASTASIO et al., 2009).

Contudo, a primeira descrição desta bactéria data de 1887, quando David Bruce isolou *Micrococcus melitensis* do baço de um soldado britânico da base naval da Ilha de Malta, que havia morrido em virtude de uma doença na época denominada “Febre de Malta” (GODFROID et al., 2005). A denominação *Micrococcus melitensis* foi baseada nas características coloniais e microscópicas da bactéria, sendo “*Micrococcus*”, em virtude do diminuto tamanho e “*melitensis*” em homenagem à ilha, visto que melita é o nome em latim de Malta (PAULIN, 2003).

Uma década depois, em 1897, na Dinamarca, Bang e Stribolt identificaram uma bactéria intracelular em fetos abortados de vacas, denominando-a de *Bacillus abortus bovis*. Esta bactéria foi utilizada em infecções experimentais com novilhas, sendo a doença denominada “doença de Bang”. Contudo, nenhuma correlação desta doença foi feita com a “febre de Malta”. Somente em 1918, nos EUA, a médica Alice Evans constatou haver uma íntima relação entre o *Bacillus abortus* e o *Micrococcus melitensis*, concluindo que as bactérias isoladas de caprinos, bovinos e humanos eram similares, sugerindo diante disso, que a doença passasse a ser chamada de brucelose em homenagem a David Bruce. Dois anos após, foi proposto à criação do gênero *Brucella* por Meyer e Shaw (PAULIN & FERREIRA NETO, 2008).

Nos anos subsequentes, a *Brucella* foi identificada em várias espécies de animais, estando associada a abortos ou outros processos patológicos, proporcionando a caracterização e classificação de diversas espécies dentro do gênero (BEER, 1992).

No Brasil, o histórico da *Brucella* data de 1914, quando Danton Seixas diagnosticou no Rio Grande do Sul a brucelose em bovinos. Três anos depois, no Ceará, Thomaz Pompeu Sobrinho observou alguns casos de abortamento em bovinos (BOLETIM, 1988).

Em meados de 1950, associado aos processos de aborto e epididimite em ovinos, foi identificada na Nova Zelândia, por Budles e Boyes e, na Austrália por Simmons e Hall, uma espécie de *Brucella*, sendo esta denominada *B. ovis*. Desde então, tem sido encontrada em várias regiões,

como a África do Sul (VAN RENSBURG et al., 1958), América do Norte (SZYFRES & CHAPPELL, 1961) e Brasil (RAMOS et al., 1966; BURGUESS, 1982; SANTOS et al., 2005), sendo considerada uma das causas mais importante de infertilidade em ovinos, tendo significativo impacto econômico na ovinocultura (LIRA & MEGID, 2009).

2 O GÊNERO *BRUCELLA*

Filogeneticamente o gênero *Brucella* é classificado dentro da subdivisão alpha2-Proteobacteria, que inclui diversas bactérias, algumas oportunistas e de vida livre como o *Ochrobactrum* e *Caulobacter* (VELASCO et al., 2000), outras relacionadas a animais ou plantas de forma patogênica, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., ou simbiótica, *Simorhizobium meliloti* (BOSCHIROLI et al., 2002).

As espécies de *Brucella* compõem um grupo de patógenos bacterianos, cocobacilares, gram-negativo, intracelular facultativo ou mais apropriadamente descrito como um patógeno intracelular facultativamente extracelular, capaz de acometer uma ampla variedade de mamíferos, inclusive o homem (YOUNG, 1995; CORBEL, 2006).

O gênero caracteriza-se por bactérias imóveis, não capsuladas, não formadoras de endósporos, medindo 0,6 a 1,5 µm de comprimento por 0,5 a 0,7 µm de largura, catalase e oxidase positivas, não fermentadoras de carboidratos, atividade variável de urease e aeróbicas, contudo algumas exigentes de atmosfera com 5 a 10% CO₂. A multiplicação é lenta em temperatura ótima de 37° C e o crescimento ocorre em meio base (água triptose de soja, água sangue ou água Columbia), por um período de 5 a 7 dias de incubação. Em alguns casos o meio precisa ser enriquecido com 5 a 10% de sangue dependendo da espécie, como por exemplo a *B. ovis* (ALTON et al., 1988; YOUNG, 1995).

Baseado nas características fenotípicas, requerimento de CO₂, produção de H₂S, sensibilidade a corantes (tionina e fucsina básica), perfil

metabólico oxidativo, susceptibilidade para específicos bacteriófagos e aglutinação com anti-soro monoespecífico, o gênero *Brucella* esta dividido em 19 biovars (BRICKER & HALING, 1995).

A *Brucella* possui ampla capacidade de sobrevivência em ambientes úmidos, pH neutro, ao abrigo de luz solar e sob matéria orgânica, como em restos placentários, produtos de aborto, fezes e pastagens (PAULIN & FERREIRA NETO, 2008). Apesar de permanecerem no ambiente, não se multiplicam nele, sendo moderadamente sensíveis aos fatores ambientais (BRASIL, 2004).

Dentro do gênero, seis espécies são consideradas clássicas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. Estando cada espécie adaptada a um hospedeiro, porém não restrita a ele (MORENO & MORIYON, 2002). Com exceção da *B. ovis* e *B. neotomae*, todas as demais espécies apresentam potencial zoonótico (HARTIGAN, 1997).

Devido ao isolamento de *Brucella* em animais marinhos, novas espécies foram acrescentadas no gênero, sendo o primeiro caso relatado em 1994, incluindo à classificação de duas novas espécies: *B. pinnipedialis* e *B. ceti*, isoladas de pinípedes (focas) e cetáceos (baleias e golfinhos), respectivamente (FOSTER et al., 2002). As espécies isoladas de mamíferos marinhos podem causar infecções em humanos, tendo relato de casos de infecção devido à exposição em laboratório e de infecções naturais que resultaram em doença neurológica (SOHN et al., 2003).

Adicionalmente, uma nova espécie de *Brucella*, denominada *B. microti*, foi isolada de *Microtus arvalis*, que é um rato silvestre (SCHOLZ et al., 2008). Recentemente também foram identificadas outras espécies de *Brucella*, uma delas é a *B. inopinata*, isolada em um implante mamário feminino e também em um paciente de 52 anos na Austrália, com uma história clínica de pneumonia destrutiva crônica (DE et al., 2008; SCHOLZ et al., 2010; TILLER et al., 2010); e outra espécie ainda não classificada foi isolada no útero de babuínos, associada a aborto, sendo confirmada através de análises bioquímicas, PCR e sequenciamento (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009).

O completo sequenciamento genômico de cinco espécies de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ovis* e *B. canis*), demonstrou baixa variabilidade genética, com alta similaridade (acima de 90%) no tamanho e composição dos genes (SRIRANGANATHAN et al., 2010). Onde cada espécie dentro do gênero possui um genoma de aproximadamente 3,29 Mb de tamanho, composto de dois cromossomos circulares, sem plasmídeos, cromossomo I com 2,11Mb e conteúdo de GC de 57,2% e cromossomo II com 1,18Mb e 57,3% de GC (SELEEM et al., 2009).

Em virtude da alta similaridade genética existente entre as espécies, bem como mediante a análise de hibridização DNA-DNA, Verger et al. (1985) sugeriram que o gênero *Brucella* deveria ser considerado mono-espécie, onde todas as amostras seriam biovars da *B. melitensis*. Contudo, estudos de polimorfismos de DNA têm demonstrado diferenciação entre as espécies, com específicas ilhas genômicas, o que corrobora com a classificação taxonômica clássica, que consiste na existência de mais de uma espécie e suas biovariedades (BRICKER & HALING, 1995; RAJASHEKARA et al., 2004).

Em concordância, a recente análise genômica da amostra *B. ovis* ATCC25840, realizada por Tsolis et al. (2009), constataram um alto percentual de pseudogenes nesta espécie, em comparação as espécies zoonóticas do gênero, além da existência de uma ilha no cromossomo II, de 26,5 Kb, contendo 28 ORFs (*open reading frames*) ausentes nas demais espécies de *Brucella* já sequenciadas, porém presente em todos os isolados analisados de *B. ovis* e em três isolados de *B. ceti*.

Baseado nessas ORFs, estudos posteriores foram realizados, sendo desenvolvida uma PCR com iniciadores específicos para essa sequência genômica, obtendo assim um método de alta eficiência para o diagnóstico de *B. ovis* em sêmen, urina, líquido prepucial e amostras de tecidos de ovinos infectados (XAVIER et al., 2010). Adicionalmente, estudos focando a compreensão da patogênese da *B. ovis* e, em especial, o seu potencial não zoonótico, estão sendo realizados através da deleção de alguns genes dessa ilha genômica (SILVA et al., 2011).

3 BRUCELOSE EM OVINOS E BOVINOS

Bactérias do gênero *Brucella* são agentes etiológicos da brucelose, uma antroponose, de distribuição mundial, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, cuja evolução é preferencialmente crônica, sendo considerada uma doença emergente ou re-emergente, de grande impacto econômico e na saúde pública (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

Uma das espécies deste gênero é a *B. ovis*, que apesar de não ser patogênica ao homem, causa uma infecção crônica, clínica ou subclínica, em ovinos, sendo caracterizada por epididimite, orquite e infertilidade nos machos, estando também ocasionalmente associada a aborto em fêmeas (FICAPAL et al., 1998). Esta espécie está distribuída mundialmente em todas as áreas onde a ovinocultura tem importância econômica, com exceção da Grã-Bretanha (BURGUESS, 1982). Em regiões, onde a criação é intensiva, a prevalência no rebanho ovino, pode variar de 9,1% a 46,7% (SERGEANT, 1994). No Brasil, um levantamento epidemiológico realizado no Rio Grande do Sul, região detentora de 24% da criação de ovinos, foi constatada soroprevalência nos carneiros de rebanhos positivos variando de 6,9 a 50% (MAGALHÃES NETO & GIL TURNES, 1996).

Em condições naturais a infecção por *B. ovis* está praticamente restrita aos ovinos (SANTOS et al., 2005), todavia, foi demonstrado na Nova Zelândia, que carneiros infectados com esta espécie pode transmiti-la para cervídeos, quando mantidos no mesmo piquete (RIDLER et al., 2000). Sob condições laboratoriais, o camundongo tem sido utilizado como modelo experimental para investigação de possíveis vacinas contra *B. ovis* (JIMÉNEZ de BAGÜÉS et al., 1993; CASSATARO et al., 2007), bem como para uma melhor compreensão da patogênese desta espécie (SILVA et al., 2011).

Outra espécie de *Brucella*, disseminada mundialmente é a *B. abortus* (BRASIL, 2006), principal causadora da brucelose bovina, ocorrendo de forma variável entre as diversas regiões geográficas, porém, constitui em um sério problema para as populações rurais dos países do Mediterrâneo,

Centro-Oeste da Ásia Ocidental e parte da África e América Latina (CORBEL, 1997). No Brasil, esta distribuída em todos os estados, sendo observada uma maior prevalência em rebanhos de corte (POESTER et al., 2002) e dados oficiais, publicados no Boletim de Defesa Sanitária Animal, mostram que a prevalência de animais positivos se manteve entre 4% e 5% no período entre 1988 e 1998 (BRASIL, 2006). A situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil não é bem conhecida, visto que, poucos estudos envolveram todo o território e, além disso, fizeram uso de metodologias diferentes (POESTER et al., 2009).

Surtos de brucelose bovina estão associados à ocorrência de abortos no terço final da gestação, nascimento de bezerros fracos, redução de fertilidade e até infertilidade em machos e fêmeas (POESTER et al., 2005). Xavier et al. (2009) através de estudos patológicos, imunohistoquímicos e bacteriológicos, realizados em 42 vacas e seus descendentes infectados por *Brucella*, constataram que as lesões mais significativas foram placentite necrosante e supurativa e, mastite linfocitocitária nas vacas, pleurite fibrinosa, pericardite fibrinosa e broncopneumonia em fetos abortados.

A *B. abortus* entra no organismo do hospedeiro pela mucosa do trato digestivo, via mais comum de infecção, genital ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. As principais fontes de transmissão para os animais são: fetos abortados, envoltórios fetais, descargas vaginais de fêmeas infectadas, entre outras, podendo determinar a enfermidade simplesmente pelo contato respiratório ou através da ingestão de pastagens ou água contaminadas com a bactéria. No rebanho ovino, os machos infectados por *B. ovis* são considerados as principais fontes de infecção, podendo o carneiro, mediante um hábito homossexual comum na espécie, favorecer a entrada da *Brucella* por diversas mucosas através do contato direto (PAOLICCHI, 2001; PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

O curso da infecção irá depender da idade e do estado reprodutivo do animal, resistência natural, estado imunológico, via de infecção, dose infectante e virulência da cepa infectante (NICOLETTI, 1980; ADAMS, 2002).

4 PATOGÊNESE

Diferentemente de outras bactérias patogênicas, a *Brucella* não apresenta fatores clássicos de virulência, como: exotoxinas, citolisinas, flagelo, cápsula, fímbria, plasmídios, fagos lisogênicos, formas de resistência, variação antigênica, lipopolissacarídeo endotóxico ou indutores apoptóticos (MORENO & MORIYON, 2001). Entretanto, apresenta capacidade de adaptação as condições ambientais, encontradas no nicho de replicação intracelular, que tem baixos níveis de nutrientes e oxigênio, pH ácido e intermediários reativo de oxigênio (KOHLEER et al., 2002).

Vários mecanismos de virulência já foram verificados no gênero *Brucella*, dentre eles: sistema de secreção do tipo IV (SST4); sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS; sistema transportador do tipo ABC; LPS (lipopolissacarídeo); β -1,2 glucans cíclicos; atividade de catalase e urease; além de determinados genes (*pgm*, *rfbE*, *pmm* e *whoA*, relacionados a síntese LPS; *cydB*, atividade citocromo oxidase; *ahpC* e *ahpD*, proteínas contra danos dos radicais de oxigênio; *purE*, síntese de purinas) entre outros (KO & SPLITTER, 2003; SELEEM, et al., 2009).

O sistema regulatório de dois componentes (BvrR/BvrS), consiste de uma proteína regulatória (BvrR) e outra pertencente a superfamília histidina-kinase, denominada sensorial (BvrS) (LÓPEZ-GÕNI et al., 2002). Sendo o mesmo, essencial para que a bactéria mude do meio extracelular para o ambiente intracelular (GUZMAN-VERRI et al., 2002), atuando no recrutamento de GTPases e polimerização das fibras de actina, que proporcionam a invasão nas células do hospedeiro (LÓPEZ-GÕNI et al., 2002). Além disso, o sistema BvrR/BvrS é importante na sobrevivência da bactéria, uma vez que os mutantes são incapazes de escapar da fusão fagossomo com o lisossomo. Adicionalmente, alguns trabalhos verificaram que os mutantes possuem reduzida multiplicação e mínima persistência esplênica em camundongos, além de exibir menor invasibilidade e replicação em macrófagos e células HeLa, estando também envolvidos na expressão de proteínas de membranas (OMPs), dentre elas, Omp25 e Omp22, diminuindo a característica de

resistência a determinados bactericidas e aumentando a permeabilidade a surfactantes (SOLA-LANDA et al., 1998; GUZMAN-VERRI et al., 2002; KO & SPLITTER, 2003).

Mecanismos também bastante importantes para o gênero *Brucella* são os sistemas transportadores do tipo ABC, constituídos por proteínas que fazem o transporte transmembrana de peptídios, poliaminas, íons, aminoácidos, ferro e sulfatos para o interior da bactéria e exportam antibióticos, ácidos graxos e toxinas da mesma (TAM & SAIER, 1993). Portanto, relacionado com a patogenicidade destas bactérias, sendo constatado que a deleção de um gene específico envolvido no transporte de polissacarídeo gerou um mutante atenuado de *B. abortus*, com possível uso para o desenvolvimento de vacinas (ROSINHA et al., 2002). Adicionalmente, estudos recentes, realizados por Silva et al. (2011), com *B. ovis*, demonstraram que o ABC transportador é de extrema importância para sobrevivência intracelular e persistência da infecção *in vitro* (macrófagos Raw 264,7) e *in vivo* (camundongos Balb/c) desta bactéria, uma vez que o mutante ABC estava atenuado 12h após a infecção, demonstrando baixa colonização esplênica em relação à amostra parental.

Outro fator relacionado à virulência corresponde ao lipopolissacarídeo (LPS), que é de fundamental importância para estrutura e integridade da membrana externa das bactérias gram negativas (CARDOSO et al., 2006), sendo constituído por três componentes interligados: uma cadeia O de polissacarídeo, que esta conectada a um oligossacarídeo central e este, por sua vez, está ligado ao lipídeo A (LAPAQUE et al., 2005). O gênero *Brucella* possui duas formas de LPS, liso e rugoso, sendo esta classificação baseada na presença (liso) ou ausência (rugoso) da cadeia O. *B. ovis* e *B. canis* expressam LPS rugoso, enquanto as demais espécies têm LPS liso (KO & SPLITTER, 2003).

O LPS apresenta pouca ação imunogênica, não ativa a via alternativa do complemento e, em contraste, com o LPS das enterobactérias, o da *Brucella* é cem vezes menos ativo e menos endotóxico que o da *Escherichia coli* (LAPAQUE et al., 2005). Essa baixa atividade biológica induzida pelo LPS

da *Brucella* é que pode contribuir para a sobrevivência deste patógeno em células fagocíticas (KO & SPLITTER, 2003). A cadeia O é responsável em parte por essa virulência associada ao LPS liso, sendo uma molécula chave na invasão e sobrevivência intracelular, visto que mutantes rugosos são incapazes de interagir com as plataformas lipídicas, sendo direcionados para a degradação no fagolisossomo. Diferentemente, espécies de LPS liso conseguem atrasar a maturação do fagossomo, mediante a interação deste LPS com as plataformas lipídicas, inibindo a fusão fagossomo com lisossomo (PORTE et al., 2003).

Além disso, a cadeia O inibe a indução a apoptose (FERNANDEZ-PRADA et al., 2003), protegendo também a bactéria intracelular de peptídeos catiônicos (FREER et al., 1996), metabólitos de oxigênio das células inflamatórias, radicais livres, lisozimas e lise mediada pelo complemento, presentes no ambiente extracelular (JIMÉNEZ de BAGÜÉS et al., 2004; LAPAQUE et al., 2005). Alguns pesquisadores observaram que a cadeia O prejudica a produção de citocinas em macrófagos humanos infectados por *Brucella*, propondo a idéia que esta poderia ser a via de defesa utilizada pelo patógeno contra o hospedeiro (RITTIG et al., 2003). Em concordância, Jiménez de Bagüés et al. (2004) analisaram esta possibilidade em modelo murino, utilizando amostras de *Brucella* lisa e mutantes rugoso. Constatando, que os mutantes tinham alta produção de TNF- α e óxido nítrico, mediante ativação dos macrófagos.

Adicionalmente, um mecanismo também bastante importante para a patogenicidade da *Brucella*, que está diretamente relacionado ao tráfego intracelular, corresponde o β -1,2 glucans cíclicos (CBGs), que interferem na maturação do vacúolo contendo a bactéria, via plataformas lipídicas, bloqueando ou atrapalhando essas plataformas e assim alterando a expressão de proteínas na membrana vacuolar, evitando a fusão com o lisossomo. Desta forma, permitindo que este vacúolo tenha uma nova rota intracelular, chegando ao nicho de replicação da bactéria (ARELLANO-REYNONO et al., 2005). β -1,2 glucans cíclicos (CBGs), fazem parte da família dos glucanos periplasmáticos osmoreguladores, presentes na membrana externa das bactérias gram-

negativas, que atuam na quimiotaxia e motilidade destas bactérias, além de promover uma estabilidade na membrana externa e sintetizar exopolissacarídeos (BOHIN, 2000). Em estudos realizados com *B.abortus*, pode-se constatar que mutantes CBGs foram atenuados em camundongos e células HeLa (BRIONES et al., 2001).

5 O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO IV (SST4)

Um dos principais mecanismos associado à virulência no gênero *Brucella* é o SST4, que corresponde uma família de proteínas (BOSCHIROLI et al., 2002). Este sistema é codificado pelo *locus virB*, um operon de 12 genes (*virB1* a *virB12*), localizado no cromossomo II (COMERCI et al., 2001; den HARTIGH et al., 2004), sendo importante para sobrevivência e replicação intracelular da *Brucella* (HONG et al., 2000).

Em estudos realizados com outros patógenos, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* e *Legionella pneumophila*, detentores de um SST4 ortólogo ao da *Brucella*, foi verificada a importância deste sistema como um fator chave na virulência, atuando na secreção e translocação de diversas macromoléculas, que variam de proteínas, DNA, peptidoglicano a toxinas multi-componentes (BOSCHIROLI et al., 2002; VIALA et al., 2004). Estruturalmente, no *A. tumefaciens*, o sistema é composto de três grupos funcionais: um pilus na superfície bacteriana (*virB2* e *virB5*), um poro transversal as duas membranas (*virB3* e *virB6-10*) e duas ATPases (*virB4* e *virB11*) na superfície citoplasmática da membrana interna que fornecem energia para o sistema, além de transportar substratos (BOSCHIROLI et al., 2002).

Extrapolando os estudos realizados com *A. tumefaciens*, foi proposto que os dois primeiros genes do operon *virB* da *B. abortus*, *virB1* e *virB2*, provavelmente estão localizados na superfície da bactéria, formando o *virB2* uma estrutura semelhante a um pilus, através do qual ele pode potencialmente

interagir com as células do hospedeiro. den Hartigh et al. (2004) verificaram que *virB1* e *virB2* são essenciais para replicação intracelular de *B. abortus* em macrófagos J774, sendo o mutante apolar *virB2* incapaz de promover persistência da infecção em modelo murino, demonstrando o papel essencial do *virB2* na função adequada do sistema de secreção do tipo IV durante a infecção.

O'Callaghan et al. (1999) caracterizaram o SST4 como um aparato transportador localizado na membrana externa, responsável pelo transporte de proteínas efetoras para o interior da célula. de Jong et al. (2008), forneceram a primeira evidência direta da secreção de proteínas efetoras pelo SST4 da *Brucella*, mediante a constatação da presença de um sistema regulatório *sensum quorum*, VjbR, de dois componentes, VceA e VceC, que são translocados dentro de macrófagos pelo SST4. Um estudo realizado com *B. melitensis*, demonstrou que o Vjbr medeia o efeito inibitório da lactona-homosserina N-dodecanoyl-DL (C_{12} -HSL) na expressão do *virB* e replicação intracelular desta bactéria (UZUREAU et al., 2007).

A *Brucella*, após ser internalizada, através do mecanismo de macropinocitose, por via lipídica (WATARAI et al., 2002), fica contida intracelularmente, em vacúolos denominados BCV (vacúolos contendo *Brucella*). Os BCVs, devido ao SST4, movem-se nas células do hospedeiro por um mecanismo de tráfego intracelular específico, que escapa da fusão com os lisossomos, impedindo a degradação bacteriana e, consequentemente possibilitando sua localização nos sítios intracelulares de replicação, no interior de vesículas associada ao retículo endoplasmático (GORVEL & MORENO, 2002; CELI et al., 2003; CELI, 2006). Desta forma, as proteínas codificadas pelo operon *virB* de *Brucella* estão diretamente relacionadas com a sobrevivência intracelular, atuando na maturação do vacúolo contendo a bactéria, bem como no transporte até o sítio de replicação (BOSCHIROLI et al., 2002b).

Além disso, o SST4 também é essencial para estimular resposta inflamatória, bem como do sistema imunológico durante infecção por *Brucella* em camundongos. Foi demonstrado que, mutante *virB* de *B. abortus* é incapaz

de estimular a expressão de genes pró-inflamatórios e resposta imune de interferon, tipo I e II, como a induzida pela cepa selvagem no baço (ROUX et al., 2007).

6 TRÁFEGO INTRACELULAR

A *Brucella* é um patógeno bacteriano intracelular, capaz de infectar fagócitos (macrófagos, monócitos e células dendríticas) e células não fagocíticas (células HeLa, Vero, fibroblastos, trofoblastos) (JIANG et al., 1993; GORVEL & MORENO, 2002; CARVALHO-NETA et al., 2008, 2010).

Ao invadir a mucosa, no sítio de entrada, microrganismos opsonizados e não opsonizados seguem livre na circulação, ou são internalizados por fagócitos que auxiliam no transporte transepitelial para a lâmina própria e submucosa, sendo depois disseminada, via sanguínea ou linfática, para os linfonodos regionais (ACKERMAN et al., 1988; GORVEL & MORENO, 2002). Nos linfonodos, ocorre intensa proliferação intracelular, com subsequente dispersão da bactéria para tecidos linfóides, como baço e linfonodos, acometendo também fígado, glândula mamária e órgãos sexuais (KO & SPLITTER, 2003). O modo como ocorre a liberação da *Brucella* do nicho de replicação intracelular para infectar outras células ainda não é bem conhecido, contudo a sua multiplicação descontrolada dentro das células, como em células trofoblásticas, provoca a morte celular e subsequente liberação do agente (ANDERSON et al., 1986).

Bactérias opsonizadas são internalizadas via complemento e receptores FC, diferentemente das não opsonizadas que provavelmente penetram através de lectina e fibronectina (CAMPBELL et al., 1994). Sendo esse fato de grande importância, visto que, a *Brucella* opsonizada é fagocitada por macrófagos ativados, ficando a mesma mais susceptível aos mecanismos bactericidas, sendo a maioria delas destruídas no interior de fagolisossomos

antes de alcançar o nicho de replicação intracelular (GORVEL & MORENO, 2002).

A internalização da *Brucella* em macrófagos ocorre via plataforma lipídica, sugerindo a existência de receptores nesta bactéria, localizados em domínios especializados da membrana plasmática. Em estudos realizados com amostras virulentas de LPS liso, *B. suis* e *B. abortus*, foi constatado que esta internalização, via plataforma lipídica, utiliza uma classe de receptor denominada *scavenger* (SR-A) (WATARAI, 2002). Além disto, a internalização é dependente da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e não induz a ativação de macrófagos (PEI et al., 2008). Esta rota de entrada envolve uma via endocítica, que escapa da fusão com lisossomos, onde esta inibição da fusão, provavelmente é restringida pela estrutura da membrana do fagossomo (NAROENI et al., 2001). Acreditava-se que a internalização através da plataforma lipídica estava associada apenas ao LPS liso, mediante a observação que mutantes rugosos não necessitavam de vias ricas em colesterol (PORTE et al., 2003), bem como da atividade da enzima PI3K (PEI et al., 2008; QIN et al., 2008), para penetrar em macrófagos, além de induzir forte ativação desses fagócitos, com excessivo estímulo de TLR4 (receptores semelhantes a Toll), em resposta à infecção (JIMÉNEZ de BAGÜÉS et al., 2004; PEI et al., 2008).

Contudo, estudos recentes realizados por Martín-Martín et al. (2010), com amostras naturalmente rugosas, *B. ovis* e *B. canis*, demonstraram que a internalização destas espécies de *Brucella* em macrófagos murinos J774 é dependente de dois componentes da plataforma lipídica, colesterol e gangliosídeos GM₁, sendo também requerido o receptor *scavenger* (SR-A). Desta forma, amostras LPS rugoso utilizam receptores de superfície celular comum as de LPS liso durante infecção em macrófagos, contudo não dependente da PI3K. Além disso, em contraste com estudos prévios (RITTIG et al., 2003; JIMÉNEZ de BAGÜÉS et al., 2004) que demonstraram a cadeia O do LPS das espécies patogênicas de *Brucella* terem impacto na ativação de macrófagos, Martín-Martín et al. (2010), constataram que *B. ovis* e *B. canis*,

induzem fraca ativação macrofágica, com indução de baixos níveis de TNF α e IL-12 em resposta à infecção.

Adicionalmente, formas rugosas de *Brucella* fixam com melhor eficiência às células do hospedeiro, quando comparadas às formas lisas. Contudo as lisas são mais eficientes no processo de invasão, indicando assim que a cadeia O do LPS está relacionada à capacidade de invasão (DETILLEUX et al., 1990). Caro-Hernández et al. (2007) verificaram que determinadas OMPs (proteínas de membrana externa), Omp25d e Omp22 são essenciais para a virulência de *B. ovis* em camundongos, sendo necessárias para a internalização e replicação desta espécie em macrófagos murinos e células HeLa.

Em células não fagocíticas, a internalização das bactérias ocorre devido à ação do citoesqueleto de actina e microtúbulos (GUZMÁN-VERRI et al., 2001) e, mesmo não tendo sido detectado ligantes bacterianos ou receptores celulares que auxiliam na invasão, há indícios da participação de moléculas específicas que determinariam a ligação do patógeno às células do hospedeiro (GORVEL & MORENO, 2002). Durante o recrutamento de estruturas do citoesqueleto, ocorre a ativação de pequenas GTPases da sub-família Rho, dentre elas Rho, Rac e Cdc42 que são requeridas para internalização da brucella em fagócitos não profissionais (GUZMÁN-VERRI et al., 2001). Outros mecanismos moleculares já foram constatados estarem envolvidos no processo de internalização da *Brucella*, dentre eles, mediadores de energia metabólica, endocitose e acidificação endossomal, GMP cíclico, outras kinases, como tirosina-kinase, MAP-kinases, entre outros (GUZMAN VERRI et al., 2001; GORVEL & MORENO, 2002).

Uma vez no interior das células do hospedeiro, mediante principalmente aos mecanismos de resistência ao ambiente acidificado, a *Brucella* redireciona o tráfego intracelular, alterando a dinâmica de maturação normal do fagossomo, bloqueando sua fusão com os endossomos e lisossomos, impedindo assim que ocorra a degradação bacteriana e, consequentemente possibilitando sua localização nos sítios intracelulares de replicação (GORVEL & MORENO, 2002; KOHLER et al., 2002). Embora o

tráfego intracelular não seja comum em todas células, visto que, em algumas, como os neutrófilos, não ocorre a multiplicação bacteriana, de forma geral, os eventos ocorridos durante o trânsito em fagócitos profissionais é semelhante aos que ocorrem nos fagócitos não profissionais (GORVEL & MORENO, 2002).

Nos estágios iniciais do tráfego intracelular da *Brucella* em macrófagos, elas são encontradas no interior de BCV's (5 a 10 minutos após a infecção), que interagem com endossomos precoces, adquirindo transitoriamente Rab5 e EEA1 (antígeno endossomal precoce/inicial). Os BCV's amadurecem mediante acidificação dos vacúolos intermediários e acumulam LAMP-1 (uma glicoproteína lisossomal associada a membrana, que permite a identificação destes vacúolos como estrutura semelhante a um autofagossomo) até 4h após a infecção. Contudo nestes BCV's maduros, foi observada pouca ou nenhuma expressão da GTPase Rab7, CIM6PR ou catpesinaD, sugerindo que o LAMP-1 não é adquirido mediante interação com endossomos tardios ou fusão com lisossomos. Os eventos que ocorrem nas primeiras 4h após a infecção é dependente do LPS e do β 1-2 glucan cíclico. Posteriormente, os BCV's intermediários interagem com sítios de saída do retículo endoplasmático - RE (ERES, 2 a 8h após a infecção). Esta interação requer a presença do SST4, que permite a fusão BCV's e RE (8 a 12h após a infecção), gerando um compartimento de replicação derivado do RE (12h após a infecção). Mediante a replicação os BCV's perdem a proteína LAMP-1 e adquirem portanto, vários marcadores RE, dentre eles, calnexin, calreticulina, sec1 β , PDI. Acredita-se que a replicação bacteriana ocorra através do processo de fissão binária (CELI et al., 2003; CELI, 2006).

7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

7.1 RESPOSTA IMUNE INATA

A imunidade inata é caracterizada por ser uma resposta imune não específica, que ocorre nos estágios iniciais da infecção, atuando na redução do

número inicial do patógeno, sem memorização, contudo, também sendo essencial para o desencadeamento da resposta imune adaptativa (KO & SPLITTER, 2003). Desta forma, a resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa, sendo o maior componente para a resistência natural da brucelose (PAIXÃO et al., 2009b).

O reconhecimento pelo hospedeiro ocorre mediante a interação dos PRRs e PAMPs. Os PRRs (*pattern recognition receptors*) correspondem os receptores responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs, que são padrões moleculares associados aos patógenos. Dentre os PRRs, o principal grupo é dos receptores semelhantes à Toll, denominados TLRs, que são expressos em macrófagos, leucócitos, células dendríticas e células epiteliais (UEMATSU & AKIRA, 2006). O reconhecimento feito por estes receptores ativa as vias de sinalização intracelular, que provoca a indução de citocinas, quimiocinas, interferons e moléculas co-estimulatórias. Outro importante PRR são os NOD, NOD1 e NOD2, proteínas de domínio de oligomerização ligadas a nucleotídeo, que são receptores da imunidade inata, envolvidos na detecção de bactérias intracelular, mediante o reconhecimento de fragmentos de peptidioglicanos estruturalmente distintos (OLIVEIRA et al., 2008).

Os TLRs são receptores transmembrana, que possuem um domínio extracelular e um intracelular. Nos mamíferos já foram identificados 13 tipos de TLRs, localizados na membrana plasmática ou em compartimentos endossomais (PAIXÃO et al., 2009b). A *Brucella* é reconhecida pelo TLR-2, TLR-4 e TLR-9, que são receptores de lipoproteínas, LPS e CpG-DNA, respectivamente (UEMATSU & AKIRA, 2006).

O reconhecimento pelos TLRs, estimula o recrutamento de grupos intracelulares de adaptadores contendo domínio TIR (Receptor Toll Il-1), dentre eles, MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM, que mediante a interação TIR – TIR inicia a sinalização. Resumidamente, o MyD88, inicia a cascata que promove a ativação de MAP quinases e a translocação do NF- κ B para controlar a expressão de citocinas inflamatórias, como por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e IL-12; enquanto que o TIRAP medeia a ativação de uma via dependente do MyD88, pelo TLR2 e TLR4. O TRIF pode

ser recrutado pelo TLR3 e TLR4 e, assim, ativar outras vias, levando a indução de fatores transcricionais IRF3, promovendo a produção de IFN I (interferon tipo 1), em especial o IFN- β . Já o TRAM participa seletivamente na ativação de uma via dependente de TRIF, através do TLR4, contudo não pelo TLR3. Desta forma, cada TLR recruta um grupo específico de adaptadores TIR, que por sua vez desencadeia diferentes fatores de transcrição que atuam na imunidade inata e auxiliam no desenvolvimento da imunidade adquirida (OLIVEIRA et al., 2008).

A membrana externa da *Brucella* é considerada um componente ativo na HKBA (*do inglês, heat killed Brucella abortus*) estimulando uma resposta via TLR2. Em macrófagos, a indução de TNF α é via TLR4 e TLR2, sendo dependente da bactéria viva, porém a IL-12 não sofre indução de ambos os TLRs. Diferentemente, TLR-9, responsável pelo reconhecimento de DNA de *Brucella* em endossomos, não é requerido em macrófagos ou células dendríticas para a indução de TNF α e IL-12, contudo induz secreção de IFN γ , mediante a presença de HKBA (PAIXÃO et al., 2009b).

Estudos recentes relataram que a *Brucella* interfere na sinalização dos TLRs, mediante a produção de proteínas que contém domínio semelhante à TIR, interferindo na sinalização via TLR/MyD88, podendo ser consideradas possíveis fatores de virulência, que atuam suprimindo a imunidade inata durante a infecção, com baixos níveis de liberação de citocinas, favorecendo a sobrevivência e persistência intracelular deste patógeno (PAIXÃO et al., 2009b). Uma dessas proteínas, nomeada Btp1 foi identificada em *B. abortus* (SALCEDO et al., 2008) e outra proteína, TcpB, em *B. melitensis* (CIRL et al., 2008). A Btp1 afeta a sinalização via TLR2, inibindo a maturação de células dendríticas e conseqüentemente sua função, alterando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (SALCEDO et al., 2008). A TcpB interage com MyD88 prejudicando a sinalização via TLR2 e TLR4, bloqueando a secreção de citocinas (CIRL et al., 2008).

A imunidade inata possui vários agentes efetores que participam durante a infecção por *Brucella*, dentre eles, complemento, neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* (NK) (PAIXÃO et al., 2009b). O

complemento corresponde um sistema de proteínas plasmáticas que interagem com fragmentos de anticorpos ou superfície bacteriana, para opsonizar ou diretamente matar o patógeno, pela formação de um complexo de ataque a membrana das bactérias gram-negativas. A ativação do complemento pode ocorrer por três vias de mecanismos: a via clássica, mediada pelo complexo antígeno-anticorpo; a via alternativa, induzida por determinadas estruturas localizadas na superfície dos microorganismos; a via das lectinas, ativada pela ligação da lectina manose a hidratos de carbono na superfície microbiana (CORBEIL et al., 1988; ROBERTSON, 1998).

As OMPs e o LPS das bactérias gram-negativas estão normalmente envolvidos na ativação da via clássica e alternativa do complemento (LAPAQUE et al., 2005), sendo estes mecanismos importantes para morte da bactéria no ambiente extracelular durante o início da invasão ou bacteremia, que pode contribuir para o controle da infecção pela *Brucella*. Entretanto, este patógeno tem a habilidade de inibir a ativação da via alternativa do complemento, pela ação do LPS, cuja cadeia O atua bloqueando o acesso de C1q a proteínas da membrana externa e, em virtude do comprimento o C3b não se adere, impedindo assim a formação de complexos estáveis de ataque à membrana. Desta forma, amostras rugosas são consideradas mais susceptíveis a morte por ação do complemento do que as amostras isogênicas lisas (EISENSCHENK et al., 1999; LAPAQUE et al., 2005).

Outro efector da imunidade inata são os neutrófilos, constituindo a primeira linha de defesa celular nas infecções por *Brucella* em humanos, demonstrando um efeito potencial na reposta inflamatória e danos aos tecidos (ZWERDLING et al., 2009). Sabe-se que o lipídeo A e o LPS de bactérias gram-negativas induzem a produção de radicais livres e lisozimas em células fagocíticas, correspondendo à atividade bactericida (RASOOL et al., 1992). Contudo, estudos prévios verificaram que a *Brucella* possui mecanismos que impedem o recrutamento acentuado de neutrófilos, além de resistir aos produtos bactericidas (BARQUERO-CALVO et al., 2007). Adicionalmente, as amostras lisas são mais resistentes a morte intracelular que as rugosas, provavelmente em virtude da cadeia O do LPS, que é um fraco indutor da

explosão respiratória e secreção de lisozimas (LAPAQUE et al., 2005). Em concordância, têm-se observado a sobrevivência da *Brucella* em neutrófilos durante estágios iniciais da infecção, levando a sugerir que os neutrófilos não têm importância no controle da infecção, podendo até mesmo, servir como carreador da bactéria para tecidos linfóides (RILEY & ROBERTSON, 1984).

Células NK são importantes na defesa contra patógenos, correspondendo um dos recursos fundamentais do sistema imune na primeira linha de defesa, atuando na morte de células alvo infectadas, bem como na produção de IFN γ (JANEWAY et al., 2001) e por isso sendo consideradas eficientes no controle de bactérias intracelulares como a *Brucella*, *Listeria* e *Salmonella* (FERNANDES et al., 1995). Células NK humanas são capazes de matar macrófagos infectados e inibir a proliferação do patógeno, sendo o efeito citotóxico mediado pelo contato célula-célula, com liberação de granzimas e perforinas dos macrófagos infectados. Contudo, alguns estudos têm mostrado que as células NK não têm um papel importante no controle inicial da infecção pela *B. abortus* em camundongos ou humanos com brucelose aguda (FERNANDES et al., 1995; KO & SPLITTER, 2003; DORNAND et al., 2004).

Um dos mais importantes efetores da imunidade inata são os macrófagos, que podem diretamente controlar ou eliminar o patógeno, bem como atuar como células apresentadora de antígeno, juntamente com as células dendríticas (PAIXÃO et al., 2009b). Atuando de forma efetora, o macrófago detecta, fagocita e mata o patógeno, mediante os mecanismos de acidificação fagossomal, produção de radicais intermediários de oxigênio (ROI) e óxido nítrico (NO), fusão fagossomo-lisossomo, com liberação de enzimas e peptídeos antimicrobianos dentro dos BCV's (JANEWAY et al., 2001). Após a fagocitose ocorre, a explosão oxidativa, ativada pela NADPH oxidase, que é importante para eliminação de *B. abortus* em macrófagos ativados por IFN γ . Esses macrófagos quando suplementados com ferro matam de forma mais eficiente o patógeno intracelular, visto que o ferro catalisa os ROI (BALDWIN et al., 1993; PAIXÃO et al., 2009b). Além disso, macrófagos infectados secretam IL-12, que atua na diferenciação dos linfócitos T auxiliar CD4+(Th0) na subpopulação Th1 que possui importante papel na resposta imune adquirida

(SPLITTER et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2002). Contudo a *Brucella* utiliza vários artifícios para evadir desses mecanismos de defesa e estabelecer a infecção, conseguindo sobreviver em compartimentos intracelulares acidificados e, adicionalmente, a acidificação inicial é essencial para a replicação intracelular (CELI et al., 2003).

7.2 RESPOSTA IMUNE ADQUIRIDA

A resposta imunológica adquirida ou adaptativa pode ser do tipo celular ou humoral, sendo a resposta do tipo celular, desencadeada pela ativação de linfócitos T específicos, considerada efetiva durante a infecção por *Brucella* em bovinos (OLIVEIRA et al., 1998). Nesta infecção, a resposta adaptativa atua através de três mecanismos chaves: produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ ativando as funções bactericidas dos macrófagos no intuito de impedir a sobrevivência intracelular; ativação da citotoxicidade das células T CD8⁺ e $\gamma\delta$, eliminando os macrófagos infectados; transferência de isotipos de anticorpos tipo Th1, como IgG2a e IgG3 que opsonizam o patógeno para facilitar a fagocitose (KO & SPLITTER, 2003). Os linfócitos T, mediante seus receptores $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, reconhecem especificamente a *Brucella*, em associação com moléculas receptoras, que são CD4⁺, em linfócitos T auxiliares, ou CD8⁺, nos linfócitos T citotóxicos. Os receptores $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ determinam os MHC (complexo maior de histocompatibilidade) nas células apresentadoras de antígenos, as células T $\alpha\beta$ CD4⁺, possuem MHC de classe II, as T $\alpha\beta$ CD8⁺, MHC de classe I e os receptores $\gamma\delta$ não expressam nem CD4⁺ ou CD8⁺, não tendo uma via de apresentação bem definida. Nas células apresentadoras de antígeno, são processados os fragmentos peptídicos da proteína antigênica, posteriormente apresentada à célula T (JANEWAY, 1992). Um papel provável das células T $\gamma\delta$ durante a infecção pela *Brucella* foi demonstrado em humanos, com aumento significativo do número destas células no sangue periférico durante a fase aguda da infecção com *B. melitensis* (BERTOTTO et al., 1993), atuando no controle do patógeno pela

combinação dos mecanismos de lise dos macrófagos infectados, via efeitos citotóxicos e redução da carga bacteriana pela secreção de peptídeos antimicrobianos e citocinas (OLIARI et al., 2005).

Desta forma, a resistência dos patógenos bacterianos intracelulares, como a *Brucella*, é dependente da habilidade do organismo desenvolver uma reposta imune do tipo celular (Th1), que é mediada pela produção de citocinas, sendo as principais INF γ , IL-12, IL-2 e TNF α . Essas citocinas ativam macrófagos, linfócitos e outros efetores do sistema imune inato ou adaptativo otimizando a capacidade de eliminação do patógeno (JANEWAY et al., 2001). De forma geral, o INF γ , ativa a função microbicida dos macrófagos, induzindo a produção de iNOS; a IL-12, induz a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8+, bem como a secreção de IL-2 e IFN γ ; a IL-2, promove a expansão clonal de linfócitos T; TNF α , ativa macrófagos e estimula a produção de IL-1, IL-6 e mais TNF α (PAIXÃO et al., 2009b). Adicionalmente, o TNF α parece não ser fundamental para o controle da replicação intracelular, não sendo essencial para indução da resposta adquirida em camundongos, contudo ativa as células efectoras da resposta pró-inflamatória, que limitam a multiplicação bacteriana (ZHAN et al., 1996).

Outras citocinas secretadas durante a infecção pela *Brucella* são a IL-10 e IL-6. A IL-10, produzida pelas células Th2 CD4⁺, macrófagos ativados e células B, tem demonstrado efeito prejudicial no controle da infecção *in vivo*, por *B. abortus* em camundongos Balb/c e *in vitro*, inibindo as funções bactericidas de macrófagos contra este patógeno, bem como diminuindo a produção de IFN γ pelos esplenócitos em resposta a estimulação por antígenos de *Brucella* (FERNANDES et al., 1995). A IL-6 é produzida por macrófagos ativados, células T e B, células do endotélio vascular, fibroblastos, queratinócitos e células mesangiais. Esta interleucina atua na inibição da expressão do MHC II induzida por IFN γ e na apresentação de antígenos por macrófagos infectados com *Brucella*, sugerindo desta forma, um efeito inibitório na função dos macrófagos durante a infecção *in vitro* (PAIXÃO et al., 2009b).

A resposta humoral também é importante, porém de menor relevância que a via celular. Sendo observado, que a transferência passiva, de

soro contendo anticorpos anti-LPS para camundongos, pode proteger contra a infecção por amostras virulentas de *B. abortus*. Além disso, a transferência de anticorpos monoclonais específicos para *B. abortus* (IgG2a) pode reduzir ou proteger os camundongos da infecção bacteriana (PHILLIPS et al., 1989; KO & SPLITTER, 2003). IgG2a e IgG3a são isótipos de anticorpos dominantes detectados a partir de camundongos infectados, semelhantes à do hospedeiro natural (ELZER et al., 1994). A opsonização provavelmente, junto com o aumento da morte intracelular, é considerada como o principal papel protetor de anticorpos contra a brucelose. Contudo, apesar de estudos relacionados ao papel da imunidade humoral na resistência a brucelose, a capacidade de anticorpos protegerem o hospedeiro ainda é controversa, necessitando de mais pesquisas (SCHURIG et al., 1991).

Cinética de infecção *in vitro* e *in vivo* - *Brucella*, lisa e rugosa

Bactérias do gênero *Brucella* são agentes infecciosos intracelulares, que infectam células fagocíticas e não fagocíticas, resultando em infecção crônica (GORVEL & MORENO, 2002), sendo a persistência da infecção dependente dos mecanismos de virulência do patógeno. No intuito da melhor compreensão desses mecanismos, experimentos *in vitro* e *in vivo* tem sido realizados com várias espécies de *Brucella*. Os principais tipos celulares utilizados em experimentos *in vitro* são: células HeLa (COMERCI et al., 2001; MARTÍN-MARTÍN et al., 2010), células trofoblásticas (CARVALHO NETA et al., 2008), macrófagos RAW 264.7 (ESKRA et al., 2003; COVERT et al., 2010) e macrófagos J774 (den HARTIGH et al., 2004; JIMÉNEZ de BAGÜÉS et al., 2004; PEI et al., 2008; ZHONG et al., 2009; MARTÍN-MARTÍN et al., 2010). Modelos animais experimentais, em especial o camundongo, também são bastante utilizados para estudo da patogênese e resposta imunológica à infecção (ROUX et al., 2007; ROLAN & TSOLIS, 2008; PAIXÃO et al., 2009a; ROLAN et al., 2009; SILVA et al., 2011).

Mediante esses estudos, determinados fatores envolvidos na patogenicidade da *Brucella* já foram identificados, dentre eles, um bastante importante é o sistema de secreção do tipo IV (SST4). Em virtude disso, vários trabalhos, como os realizados com espécies patogênicas de *Brucella*, *B. abortus* (COMERCI et al., 2001; ROUX et al., 2007; ROLAN & TSOLIS, 2007, 2008; ROLAN et al., 2009) e *B. melitensis* (PAIXÃO et al., 2009a; ZHONG et al., 2009; WANG et al., 2010), têm sido desenvolvidos para avaliar o papel deste sistema no curso da infecção. Contudo, não existem estudos em espécies naturalmente rugosas, como a *B. ovis*, o que levou a realização deste trabalho. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel do SST4 na internalização e sobrevivência de amostras de *Brucella*, lisa e rugosa, por meio de infecções *in vitro* (linhagem celular Raw 264.7) e *in vivo* (camundongos Balb/c).

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 AMOSTRAS BACTERIANAS, LINHAGEM CELULAR E CAMUNDONGOS

Foram utilizadas neste estudo *Brucella ovis* ATCC 25840, *Brucella abortus* 2308 e amostra vacinal de *Brucella abortus* RB51, provenientes do Laboratório de Patologia Molecular, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As amostras de *B. abortus* e RB51 foram semeadas em ágar triptose de soja – TSA (Acumedia, Brasil) e amostras de *B. ovis* em TSA suplementado com 10% hemoglobina (Becton-Dickinson, EUA).

A linhagem celular imortalizada de macrófagos murino Raw 264.7, utilizada na infecção *in vitro*, foi gentilmente cedida pelo Prof. Sérgio Costa Oliveira (Departamento de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas - ICB da UFMG). O cultivo celular foi realizado em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 1% aminoácidos não essenciais (Gibco), 1% piruvato de sódio (Gibco), 1% L-glutamina (Gibco), 2% de bicarbonato de sódio (Gibco) e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - Gibco).

Camundongos machos Balb/c, de 7 a 8 semanas de idade, oriundos do Biotério do ICB da UFMG foram utilizados na infecção *in vivo*. Antes da infecção, esses animais passaram por um período de adaptação de 5 dias na Escola de Veterinária da UFMG, com alimentação, ração peletizada, e água *ad libitum*. A utilização desses animais no experimento foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG), sob o protocolo nº 136/08.

Toda a manipulação das amostras bacterianas, bem como de camundongos e células infectadas com *Brucella* sp., foi realizada no laboratório de biossegurança nível 3, na Escola de Veterinária da UFMG, obedecendo as normas e procedimentos laboratoriais do mesmo.

1.2 MUTAGÊNESE

1.2.1 Construção do plasmídeo

No presente estudo foram utilizados mutantes oriundos de uma deleção polar do gene *virB2* do operon *virB*, lotado no cromossomo II nas espécies de *Brucella*. Os mutantes, $\Delta virB2$ RB51, $\Delta virB2$ *B. abortus* e $\Delta virB2$ *B. ovis*, foram obtidos através da introdução do plasmídeo pAV2.2, desenvolvido por den Hartigh et al. (2004) e gentilmente cedido para realização deste estudo.

O plasmídeo pAV2.2 possui um cassete de resistência a canamicina interrompendo o gene *virB2*, sendo elaborado resumidamente da seguinte forma: fragmentos anterior (*virB988-1562*) e posterior (*virB1796-2458*) do gene *virB2* de *B. abortus* foram amplificados por PCR e clonados em pCR2.1 TOPO. Enzimas *XhoI* e *Clal* foram utilizadas para digerir o fragmento anterior, sendo este posteriormente inserido no pBluescript KS. O fragmento posterior foi digerido pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*, sendo em seguida clonado no pBluescript contendo o fragmento anterior. O gene de resistência a canamicina *Tn903* foi amplificado a partir do vetor PUC-KSAC, sendo digerido com as enzimas *EcoRI* e *Clal* e clonado no pBluescript que continha o fragmento anterior e posterior amplificado, gerando desta forma o plasmídeo.

1.2.2 Eletroporação

Os mutantes $\Delta virB2$ *B. abortus* e $\Delta virB2$ *B. ovis* foram previamente obtidos no Laboratório de Patologia de Molecular da UFMG e amostra $\Delta virB2$ RB51 foi obtida neste trabalho.

Amostra de *B. abortus* RB51 foi semeada em placa de TSA e incubada em estufa à 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂ por 3 dias. Após este período, colônias foram ressuspensas da placa de TSA, com auxílio de alça descartável estéril, em 50 ml de caldo triptose de soja (TSB - Becton-Dickinson, EUA), sendo posteriormente incubadas sob agitação à 37°C, 200

rotações/minuto, por 15 a 16 horas (Certomat® BS-1, Biotech International, Korea). Então, a suspensão bacteriana foi precipitada, através de três sucessivas centrifugações (4000g, por 20 minutos, à 4°C), o pellet de bactéria lavado por ressuspensão em 20ml de água purificada por osmose reversa estéril gelada. Ao fim foi obtido, 1 ml da suspensão de *B. abortus* RB51 eletrocompetente, mantido no gelo até a eletroporação.

No momento da eletroporação, 5 µl do plasmídeo pAV 2.2 foram adicionados a 50 µl da suspensão da amostra eletrocompetente supracitada. Esta solução foi colocada em uma cubeta estéril de 0,1 cm (BioRad Laboratories, EUA) e acoplada ao aparelho eletroporador (BioRad Laboratories, EUA), que emitiu um choque de 2,2 KV em 5,5 ms. Finalizando a eletroporação, foi adicionada à cubeta 1 ml de meio SOC-B (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose), transferindo para criotubo de 1,5 ml e incubado por 16 horas sob agitação a 37°C. Cem microlitros da amostra foi plaqueada em meio TSA sem antibiótico, incubando em estufa à 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂, por 4 a 7 dias. O restante da solução contida no criotubo foi submetido à centrifugação à 4000g por 2 minutos, desprezado o sobrenadante, o pellet ressuspendido e plaqueado em meio TSA sem antibiótico e incubado como descrito acima.

Após o período de incubação, as colônias presentes nas placas, foram repassadas para duas outras placas de TSA, sendo ambas suplementadas com antibiótico, uma placa com canamicina 100 µg/ml (Gibco) e outra com ampicilina a 200 µg/ml (Gibco). Essas placas foram incubadas em estufa à 37°C, 5% CO₂, por 4 a 7 dias, sendo selecionadas as colônias sensíveis a ampicilina e resistentes a canamicina, semeando-as em nova placa de TSA contendo canamicina, para confirmação da resistência ao antibiótico.

1.2.3 Confirmação da mutação por PCR convencional

A deleção do gene *virB2* na amostra de *B. abortus* RB51 foi confirmada através da realização da PCR convencional, onde utilizou-se iniciadores (primers) específicos *virB* senso e antisenso (Tabela 1) para confirmar a mutação. Adicionalmente, como controle interno, foram utilizados os iniciadores *BrucellaP31*-senso e *BrucellaP31*-antisenso (BAILY et al., 1992), promovendo a amplificação do gene *bcsp* 31, que codifica uma proteína da superfície celular, conservada entre as espécies do gênero *Brucella*.

Colônias de *Brucella*, resistentes ao antibiótico canamicina, foram selecionadas e retiradas com auxílio de alças descartáveis estéreis da placa, ressuspendidas em 100 µl de água osmose reversa estéril, inativadas a 100°C por 10 minutos, centrifugadas a 12000g por 2 minutos a 18°C e, o sobrenadante contendo o DNA bacteriano utilizado para realização da PCR.

O protocolo utilizado para PCR foi: 23 µl de mix (Supermix, Invitrogen); 0,75 µl de cada primer (25 µM); 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 µl do DNA das colônias. Um volume total de 25 µl foi submetido à amplificação, cujos parâmetros utilizados foram: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos; 30 ciclos com desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto e 30 segundos; extensão final à 72°C por 10 minutos. Foi utilizado como controle positivo da reação de PCR colônia de *B. abortus* RB51, cujo produto esperado era de 734 pb. O produto amplificado foi verificado mediante gel de agarose a 1%, tendo o mutante, em virtude da inserção do cassete de canamicina, um produto esperado de 1521 pb.

Adicionalmente foi realizado um PCR multiplex, AMOS-ENHANCED, descrito por Bricker & Halling (1995) como controle positivo, confirmando a amostra RB51, distinguindo-a de outras cepas clássicas como: *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitens*, *B. suis* e amostra vacinal B19, sendo usado iniciadores específicos, listados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para PCR convencional.

NOME	SEQUÊNCIA (5' – 3')	ORIGEM
virB-senso	CAGGATGCGCTCTAACACAA	Silva et al. (2011)
virB-antisenso	TACGATCAGCGGCAATATGA	Silva et al. (2011)
BrucellaP31-senso	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	Baily, et al. (1992)
BrucellaP31-antisenso	CGCGCTTGCCCTTTCAAGGTCTG	Baily, et al. (1992)
Amos A-senso	GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC	Bricker & Halling (1995)
Amos M-senso	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA	Bricker & Halling (1995)
Amos O-senso	CGGGTTCTGGCACCATCGTCG	Bricker & Halling (1995)
Amos S- senso	GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG	Bricker & Halling (1995)
Amos IS-antisenso	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	Bricker & Halling (1995)
Eri-1 senso	GCGCCGCGAAGAACTTATCAA	Bricker & Halling (1995)
Eri 2 antisenso	CGCCATGTTAGCGGCGGTGA	Bricker & Halling (1995)
RB51 -2308 senso	CCCCGGAAGATATGCTTCGATCC	Bricker & Halling (1995)

1.3 CULTIVO CELULAR

Macrófagos Raw 264,7 foram cultivados em frascos descartáveis estéreis, em meio RPMI suplementado com 10% SFB, à 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂, sendo a relação entre células e meio de 1:5. O meio de cultivo foi trocado a cada 2-3 dias, considerando a acidificação do mesmo. Sub-cultivos foram realizados de acordo com a confluência celular acima de 90%, sendo as células desprendidas da garrafa, com auxílio de um “cell scraper” descartável e estéril, em seguida homogeneizadas com pipeta pasteur estéril e, transferidas para uma nova garrafa de cultivo contendo meio RPMI suplementado 10% SFB, pré-aquecido à 37°C.

Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5x10⁵ células/ml, sendo semeado 100 µl/poço. Para tal procedimento, as células foram desprendidas da garrafa de cultivo como supracitado, sendo transferidas para um tubo falcon estéril e, em seguida, centrifugadas à 18°C, 1000g, por 5 minutos. Posteriormente, o pellet de células formado ressuspendido com 1 ml de RPMI suplementado 10% SFB, sendo esta suspensão celular utilizada para a contagem. A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando azul de tripan a 0,3%, na diluição 1:10.

1.4 CURVA DE CRESCIMENTO *IN VITRO* *Brucella ovis*

Amostras parental e mutantes de *B. abortus* sabidamente crescem em meio líquido atingindo fase platô do crescimento exponencial em 18 horas (SUN et al., 2005). Porém, não se conhece a curva de crescimento de amostras de *B. ovis*. Em experimentos prévios, observou-se que as amostras de *B. ovis* não apresentam crescimento exponencial adequado, em meio líquido, por exemplo TSB, como é descrito na literatura para outras espécies de *Brucella* spp. (ZHONG et al., 2009). Portanto, procedeu-se o crescimento *in vitro* em placa. Resumidamente, inóculos com aproximadamente 1×10^3 UFC/ml da amostra selvagem e mutante de *B. ovis* foram preparados individualmente e 100 µl do inóculo foi semeado em placa contendo TSA suplementado com 10% hemoglobina, seguido de incubação em estufa à 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂.

Nos respectivos tempos de incubação: 0, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h após o plaqueamento do inóculo, duas placas de cada amostra foram lavadas com 1 ml de PBS estéril nos tempos de 0 a 48 h e 2 ml de 72 a 120 h. A solução obtida da lavagem foi submetida a diluições seriadas 10-fold, plaqueada em duplicata três diluições, em meio TSA suplementado com 1% hemoglobina e incubados como descrito acima por 4 a 7 dias. A contagem das UFC foi determinada em relação ao volume em mililitros utilizado na lavagem para cada tempo analisado.

1.5 INFECÇÃO *IN VITRO*

1.5.1 Preparo do inóculo

Amostras de *Brucella*, parental e mutantes *virB2* de *B. abortus*, RB51 e *B. ovis* foram utilizadas como inóculo da infecção *in vitro*, sendo a multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 1:100, correspondendo a 5×10^7 UFC/ml.

As amostras selvagens foram plaqueadas com auxílio de alça descartável estéril em meio TSA, sendo as amostras mutantes plaqueadas em TSA suplementado com 100 µg/ml de canamicina. As placas foram incubadas à 37°C com 5% CO₂, por 3 dias, que corresponde a fase exponencial de crescimento de *Brucella* em placa. As colônias presentes nas placas foram ressuspensas em PBS estéril, sendo posteriormente homogeneizadas em vórtex, realizado diluições seriadas e, submetidas à quantificação das UFC, através da leitura de absorbância em OD₆₀₀ por espectrofotometria (SmartspecTM300, BioRad, CA), considerando uma unidade de absorbância em OD₆₀₀ equivalente a $2 - 4 \times 10^9$ UFC/ml de *Brucella* sp.

Para confirmação dos inóculos, estes foram submetidos a diluições seriadas, sendo em seguida plaqueadas 03 diluições, em duplicata, em meio TSA com ou sem canamicina 100 µg/ml. Posteriormente, as placas foram incubadas à 37°C com 5% CO₂, por 4 dias para a contagem de UFC.

1.5.2 Infecção

Macrófagos Raw 264.7 previamente semeados nas placas de 96 poços foram infectados com 100 µl de inóculo contendo aproximadamente 5×10^7 UFC/ml, sendo em seguida a placa submetida à centrifugação à 18°C, 4000g, por 5 minutos, com posterior incubação à 37°C com 5% CO₂, por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas uma vez com PBS estéril, seguida de reposição do meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 µg/ml de gentamicina (Gibco), seguido de incubação à 37°C, por 1 hora objetivando a morte das bactérias extracelulares.

Na sequência, cada poço foi lavado uma vez com PBS estéril e, nos respectivos tempos após a infecção de 0, 4, 24 e 48 h, os macrófagos foram lisados com 100 µl de água destilada estéril por aproximadamente 20 minutos.

Nas demais células ainda não lisadas, foi realizada a troca do meio RPMI suplementado com 10% SFB e 25 µg/ml de gentamicina. A solução oriunda da lise foi submetida a diluições seriadas em PBS estéril, sendo em seguida plaqueadas 03 diluições, em duplicata, em meio TSA com ou sem 100 µg/ml canamicina. Estas placas foram incubadas à 37°C com 5% CO₂, finalizando com a contagem de UFC após 4 dias. Cada inóculo foi analisado em triplicata a cada tempo. Os resultados da infecção *in vitro* correspondem à média de no mínimo três experimentos realizados de forma independente, sob as mesmas condições e procedimentos laboratoriais.

Como controle do experimento, macrófagos não submetidos à infecção, porém semeados na placa de 96 poços, foram plaqueados no tempo de 48 h, em meio TSA, objetivando averiguar a esterelidade celular. Adicionalmente, para avaliar a eficiência do antibiótico utilizado, amostras de *Brucella* foram semeadas com 100 µg/ml de canamicina, sendo plaqueadas no tempo de 48 h em meio TSA.

1.6 INFECÇÃO IN VIVO

1.6.1 Infecção

Quarenta e oito camundongos Balb/c, machos, 7 a 8 semanas de idade, foram divididos em quatro grupos, de acordo com o inóculo - *B. abortus*, $\Delta virB$ *B. abortus*, *B. ovis* e $\Delta virB$ *B. ovis*, com quatro animais em cada grupo. Esses camundongos foram infectados, por via intraperitoneal, com 100 µl de inóculo. O inóculo foi preparado sob os mesmos procedimentos supracitados para a infecção *in vitro*, contudo a concentração utilizada foi de aproximadamente 1×10^7 UFC/ml.

Adicionalmente, um grupo de quatro camundongos Balb/c foi utilizado como controle, sendo os mesmos tratados com 100 µl de PBS estéril por via intraperitoneal.

1.6.2 Recuperação de macrófagos peritoneais e coleta de órgãos

Às 6, 12 e 24 h após a infecção, os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical e, em seguida, pesados. Após assepsia, com álcool etílico à 70%, da superfície corporal, a pele da região abdominal foi rebatida e 10 ml de PBS Dulbecco estéril (Gibco) com 0,02% de KCl gelado, foi injetado na cavidade abdominal, com auxílio de seringa e agulhas estéreis, conforme o protocolo descrito por Zhang et al. (2008). A aspiração da solução foi realizada imediatamente, sendo transferida para um tubo falcon de 15 ml estéril, mantido em gelo.

Com intuito de avaliar a quantidade de UFC extracelular, 100 µl proveniente da lavagem da cavidade peritoneal foi plaqueado em meio TSA com ou sem 100 µg/ml de canamicina, em duplicata, após diluições seriadas em água estéril, para estimar a quantidade de UFC intracelular, a solução da lavagem restante foi submetida à centrifugação à 4°C, 400g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de macrófagos ressuspendido delicadamente com 500 µl de RPMI suplementado com 10% SFB e gentamicina 50 µg/ml, com posterior incubação à 37°C com 5% CO₂, por 1 hora, objetivando a morte das bactérias extracelulares. Em seguida, realizou-se nova centrifugação sob as mesmas condições, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu os macrófagos com 1 ml de meio RPMI suplementado 10% SFB. Uma última centrifugação foi realizada e, na sequência os macrófagos foram lisados com a adição de 300 µl de triton X-100 a 0,01%, homogeneizados em vórtex, submetidos a diluições seriadas em PBS estéril e plaqueados em meio TSA com ou sem 100 µg/ml de canamicina, incubando as placas à 37°C com 5% CO₂, por 4 a 7 dias. A soma das UFC, obtidas na contagem extracelular e intracelular, determinou a quantidade total de bactéria na cavidade peritoneal.

Após a recuperação dos macrófagos peritoneais, procedeu-se a abertura da cavidade abdominal com auxílio de pinça anatômica e tesoura estéril, sendo assepticamente retirados o baço e fígado desses animais.

No intuito de avaliar um processo de infecção sistêmica, o baço foi pesado e fragmentos deste órgão foram coletados em PBS estéril para bacteriologia. Além disso, foram coletados fragmentos de baço para análises, histológica e imunohistoquímica e, em nitrogênio líquido para extração de RNA e avaliação de expressão gênica por RT-PCR quantitativo. Fragmentos de fígado foram fixados em formalina tamponada a 10% para processamento histológico e imunohistoquímico.

1.6.3 Bacteriologia

Fragmentos de baço foram submetidos à análise bacteriológica, sendo estes colocados individualmente em tubos falcon estéreis de 50 ml, contendo 2 ml de PBS estéril 1X. Em seguida, foram macerados com auxílio de um homogeneizador (Hamilton Beach, EUA). Este homogeneizado de tecido foi então, submetido a diluições seriadas em PBS estéril e plaqueados em meio TSA com ou sem canamicina, incubados à 37°C com 5% CO₂, por 4 a 7 dias para contagem das UFC.

A contaminação entre as amostras foi prevenida com a lavagem da haste de aço inox a cada maceração, sendo duas vezes em água estéril, seguida de álcool etílico absoluto e, uma última lavagem em água estéril.

1.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes à contagem de UFC foram submetidos à transformação logarítmica e analisados pela ANOVA. As médias dos grupos analisados foram comparadas pelo teste de Tukey (GraphPad InStat 3.0, EUA) sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

2 RESULTADOS

2.1 MUTAGÊNESE - $\Delta virB2$ RB51

O mutante $\Delta virB2$ RB51 foi obtido através da deleção polar do gene *virB2* na amostra de *B. abortus* RB51, com inserção no local de um cassete de resistência a canamicina. Esta deleção foi confirmada através de PCR convencional, utilizando iniciadores específicos para a região deletada, correspondente ao operon *virB*. Nas amostras selvagens foi observada a amplificação de um produto de 734 pb, enquanto que na mutante, devido ao cassete de canamicina, o amplificado foi maior, um produto 1521 pb (Figura 1A). Adicionalmente, a amostra mutante foi submetida a duas outras PCR como controle interno, sendo uma delas para confirmar o gênero *Brucella*, mediante a utilização de iniciadores que amplificam o gene *bcsp31*, codificador de uma proteína de superfície celular conservada entre as espécies deste gênero, obtendo um produto 223 pb (Figura 1B). Outra, denominada PCR AMOS-ENHANCED foi realizada objetivando confirmar se o mutante gerado advém da amostra *B. abortus* RB51, além de diferir das outras espécies clássicas do gênero e da amostra vacinal B19 (Figura 2).

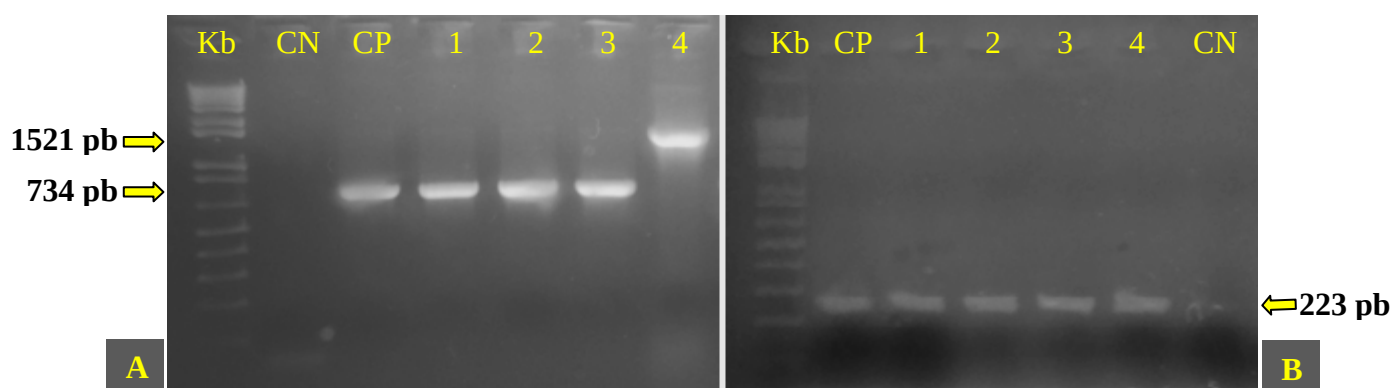


Figura 1. A: Confirmação da mutagênese *ΔvirB2* RB51. Realização de PCR convencional utilizando iniciadores específicos para o operon *virB*; 1, 2 e 3 – amostras selvagens de *B. abortus* RB51, com amplificação de um produto de 734 pb, referente ao operon analisado; 4 – mutante *ΔvirB2* RB51, tendo um produto amplificado maior, com 1521 pb, devido a inserção do cassete de canamicina. **B:** PCR convencional, com iniciadores específicos para o gene *bcs31*, que é conservado nas espécies do gênero *Brucella*; 1, 2 e 3 – amostras *B. abortus* RB51 e 4 - *ΔvirB2* RB51, todas com amplificação de um produto de 223 pb, referente ao gene analisado.

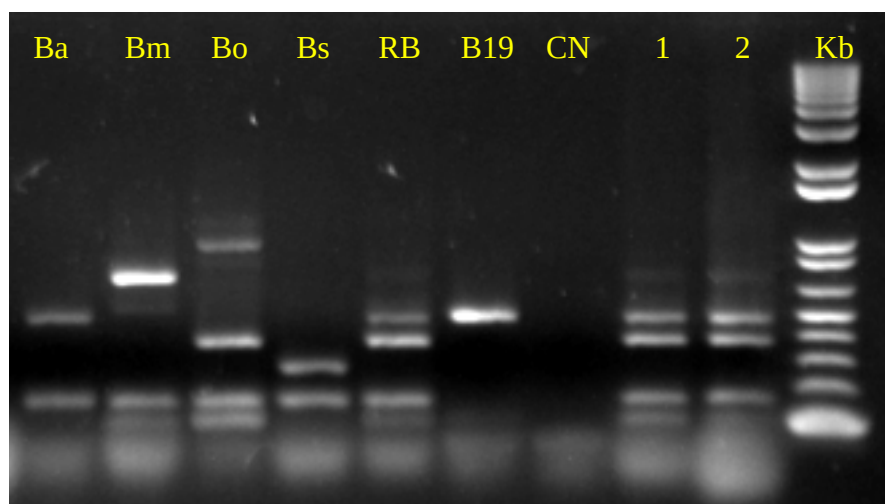


Figura 2. PCR multiplex AMOS-ENHANCED. Seis amostras de referência do gênero *Brucella* foram utilizadas como controle positivo: Ba, *B. abortus* 544 (498 pb e 178 pb); Bm, *B. melitensis* 16M (731 pb e 178 pb); Bo, *B. ovis* reo 198 (976 pb, 364 pb e 178 pb); Bs, *B. suis* (285 pb e 178 pb); RB, amostra vacinal RB51 (498 pb, 364 pb e 178 pb) e B19, amostra vacinal B19 (498 pb). 1 e 2 correspondem às amostras analisadas; 1 – amostra parental de *B. abortus* RB51 utilizada na mutagênese; 2 - amostra mutante *ΔvirB2* RB51, ambas com amplificadas semelhantes a amostra vacinal RB51 (498 pb, 364 pb e 178 pb).

2.2 CURVA DE CRESCIMENTO

Sob condições de crescimento *in vitro*, *B. ovis* e $\Delta virB$ *B. ovis*, apresentam a mesma cinética de crescimento.

Amostras *B. ovis* e $\Delta virB$ *B. ovis* foram submetidas ao crescimento *in vitro*, sendo avaliadas por um período de 120 horas. Experimentos prévios demonstraram que amostras de *B. ovis* não apresentam crescimento exponencial adequado em meio líquido TSB, diferindo de outras espécies de *Brucella*, sendo por isso realizado o crescimento em meio sólido TSA, suplementado com 10% de hemoglobina.

A cinética de crescimento das amostras, selvagem e mutante, foi semelhante, demonstrando que a deleção do operon *virB* não inviabilizou o crescimento da amostra mutante *in vitro* (Figura 3). A fase exponencial de crescimento corresponde o intervalo de tempo de 24 à 72h, onde pode ser verificado um aumento de aproximadamente 5 vezes, correspondendo 10^9 UFC/ml, seguida da fase estacionária em ambas as amostras. O intervalo de crescimento mais rápido, onde foi constatado o aumento em dobro da massa bacteriana, condiz ao tempo de 24 à 48 h após semeadura no meio.

Características morfológicas das UFC de *B. ovis* e $\Delta virB$ *B. ovis*, foram observadas durante o crescimento *in vitro*, não sendo verificado entre as mesmas diferenças no tocante a formato, tamanho e coloração das UFC, crescendo as amostras, portanto, de modo fenotipicamente semelhante, bem como em tempo igualitário.

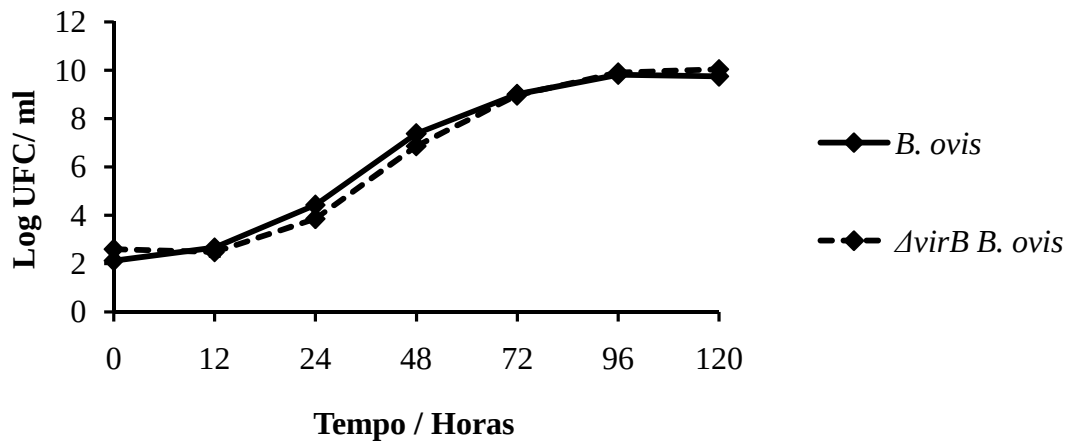


Figura3. Curva de crescimento *in vitro* da amostra parental *Brucella ovis* e mutante $\Delta virB$ *B. ovis*, em meio TSA suplementado com 1% de hemoglobina, incubadas à 37°C com 5% CO₂. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica, representando à média e desvio padrão de triplicatas por cada tempo analisado.

2.3 CINÉTICA DE INFECÇÃO *IN VITRO*

A internalização de amostras, lisa e rugosa, de *Brucella* não é influenciada pelo operon *virB*.

Ao avaliar a importância do operon *virB*, no processo de internalização de *Brucella* spp., macrófagos murinos Raw 264.7 foram infectados com 5×10^7 UFC/ml de amostras selvagens – *B. ovis*, *B. abortus*, *B. abortus* RB51 e mutantes - $\Delta virB$ *B. ovis*, $\Delta virB$ *B. abortus* e $\Delta virB$ *B. abortus* RB51. Todas as cepas, selvagens e mutantes, LPS liso ou rugoso, apresentaram o mesmo perfil de internalização 1 h após a infecção (Figura 4). Amostras mutantes, nas quais foi deletado o gene *virB2*, apresentaram capacidade de internalização similar a amostra selvagem correspondente, sem diferença estatística significativa. Dados estes, proporcionaram a certeza que o operon *virB* não influencia no processo de internalização, mantendo o mutante *virB2*, a capacidade de invasão em células fagocíticas como os macrófagos.

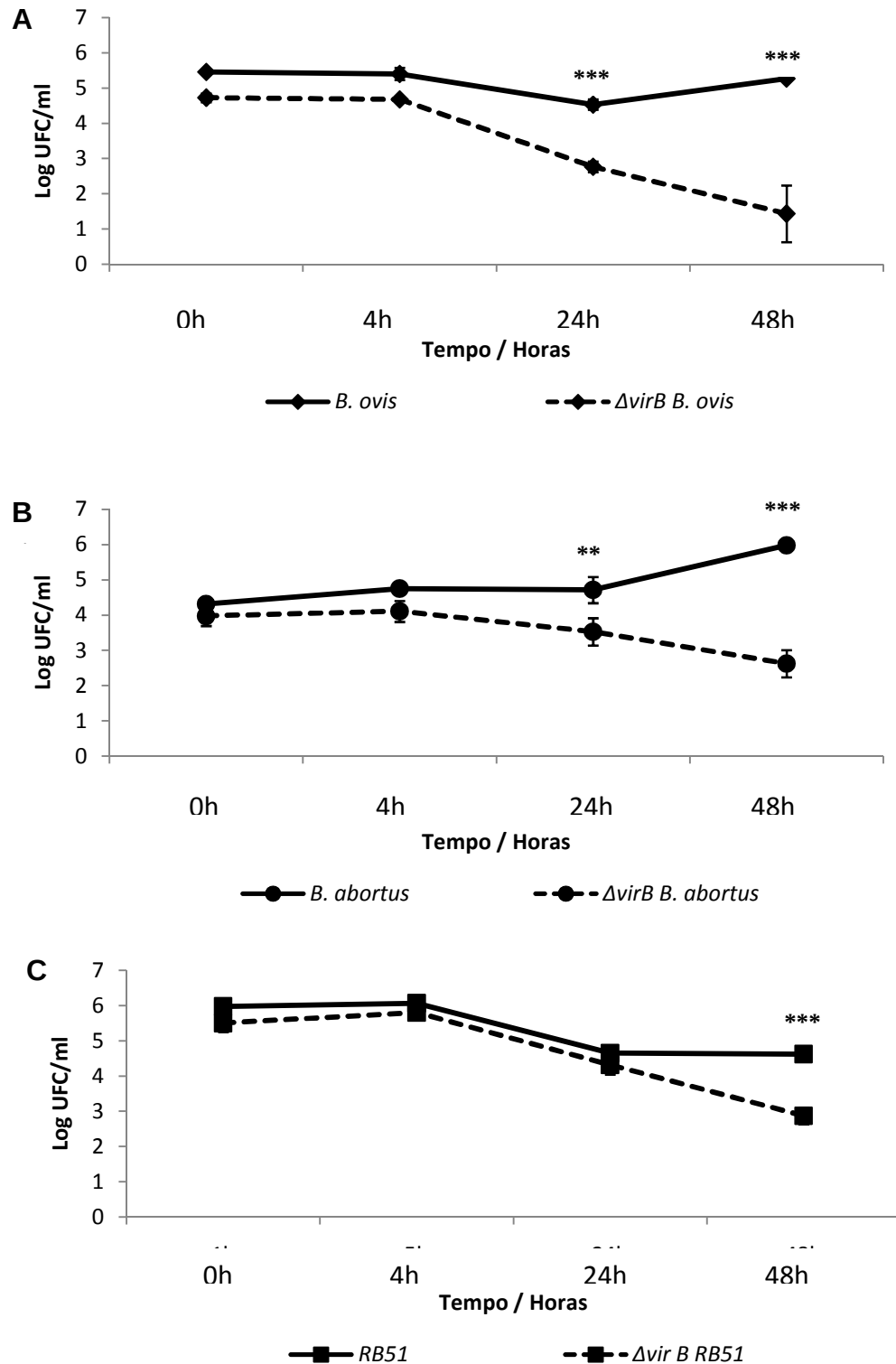


Figura 4. Cinética de infecção *in vitro* em macrófagos Raw 264.7, nos tempos de 0, 4, 24 e 48 h pós-infecção, fazendo um comparativo entre amostras parentais: *B. ovis* (A), *B. abortus* (B) e *B. abortus* RB51 (C) e as mutantes *virB* correspondentes. Contagens de UFC foram submetidas à transformação logarítmica, representando à média e desvio padrão de triplicatas em cada tempo. Os dados são referentes a um experimento, sendo representativo de no mínimo três experimentos independentes sob as mesmas condições. A diferença estatística entre as amostras está indicada por asterisco (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Amostras rugosas têm uma maior capacidade de internalização, em especial a *B. abortus* RB51.

Na infecção *in vitro*, as amostras de *Brucella* analisadas neste experimento demonstraram cinética de infecção semelhante, contudo as de LPS rugoso, *B. ovis* e RB51, apresentaram maior capacidade de internalização em relação à amostra lisa de *B. abortus*. A amostra vacinal RB51 apresentou diferença estatística significativa em relação a *B. abortus* ($p < 0,001$) e a *B. ovis* ($p < 0,05$) (Figura 4). Sugerindo, que o LPS da *Brucella* influencia no processo de internalização. Comportamento semelhante pode ser observado ao analisar entre mutantes provenientes de amostras lisa e rugosa, tendo o $\Delta virB$ RB51 maior potencial de invasão em células fagocíticas que o $\Delta virB$ *B. ovis* ($p < 0,01$) e o $\Delta virB$ *B. abortus* ($p < 0,001$). Adicionalmente, também foi constatada diferença estatística na internalização entre *B. abortus* e *B. ovis* ($p < 0,001$), bem como entre os respectivos mutantes.

O SST4 é fundamental para sobrevivência e replicação de *B. ovis*, *B. abortus* e *B. abortus* RB51.

Ao avaliar a cinética intracelular de *B. ovis*, *B. abortus*, *B. abortus* RB51 e seus respectivos mutantes *virB*, foi verificado que no início da infecção até 4 h.p.i., todas as amostras possuíam o mesmo perfil de sobrevivência. Todavia nos tempos de 24 e 48 h.p.i., observou-se uma diminuição progressiva no número de UFC das amostras mutantes (Figura 4). Amostra parental *B. ovis*, a partir de 24 h.p.i. já demonstrava diferença estatística significativa em relação a mutante $\Delta virB$ *B. ovis*, diferença esta que com a evolução da infecção aumentou, sendo no tempo de 48 h.p.i., de extrema significância ($p < 0,001$), indicando assim, a atenuação da cepa mutante *virB*. Para os mutantes $\Delta virB$ RB51 e $\Delta virB$ *B. abortus* também foi observado diminuição significativa nos valores de UFC durante a infecção *in vitro*. Estes resultados suportam a idéia que o SST4 é essencial para sobrevivência e replicação intracelular de *Brucella* spp. em células fagocíticas.

2.4 CINÉTICA DE INFECÇÃO *IN VIVO*

Adicionalmente ao estudo *in vitro*, foi realizada infecção *in vivo* em camundongos Balb/c, com amostras selvagens (*B. ovis* e *B. abortus*) e mutantes ($\Delta virB$ *B. ovis* e $\Delta virB$ *B. abortus*), por inoculação de aproximadamente 1×10^6 UFC/animal por via intraperitoneal, que favorece a imediata disseminação sistêmica da bactéria. Este experimento teve o objetivo de comparar a sobrevivência dessas amostras no meio extracelular e intracelular, por 6, 12 e 24 h p.i.

O mutante $\Delta virB$ *B. ovis* possui menor capacidade de sobrevivência extracelular e multiplicação intracelular, apresentando baixa colonização esplênica, em camundongos Balb/c, quando comparado a amostra parental.

Amostras rugosas, *B. ovis* e $\Delta virB$ *B. ovis*, demonstraram no início da infecção (6 h p.i.), quantidade de UFC similares (Figura 5A), recuperadas da cavidade peritoneal dos camundongos infectados. Contudo, em tempos posteriores, 12 e 24 h p.i., foi observada diferença significativa crescente entre a amostra selvagem e a mutante, com redução do número de UFC do $\Delta virB$ *B. ovis*, estando este praticamente eliminado da cavidade 24h após a infecção. Intracelularmente, nos macrófagos peritoneais, também foi observada, a partir de 12h p.i. (Figura 5B), diferença estatística significativa entre a amostra parental e a mutante, com significância de $p < 0,001$ 24 h p.i. De forma contrária ao mutante $\Delta virB$ *B. ovis*, a amostra parental conseguiu sobreviver e multiplicar no interior dessas células, aumentando em aproximadamente 1 log o número de UFC, no intervalo de 12 às 24 h p.i. Perfil semelhante foi observado durante a infecção *in vitro* em macrófagos Raw 264.7.

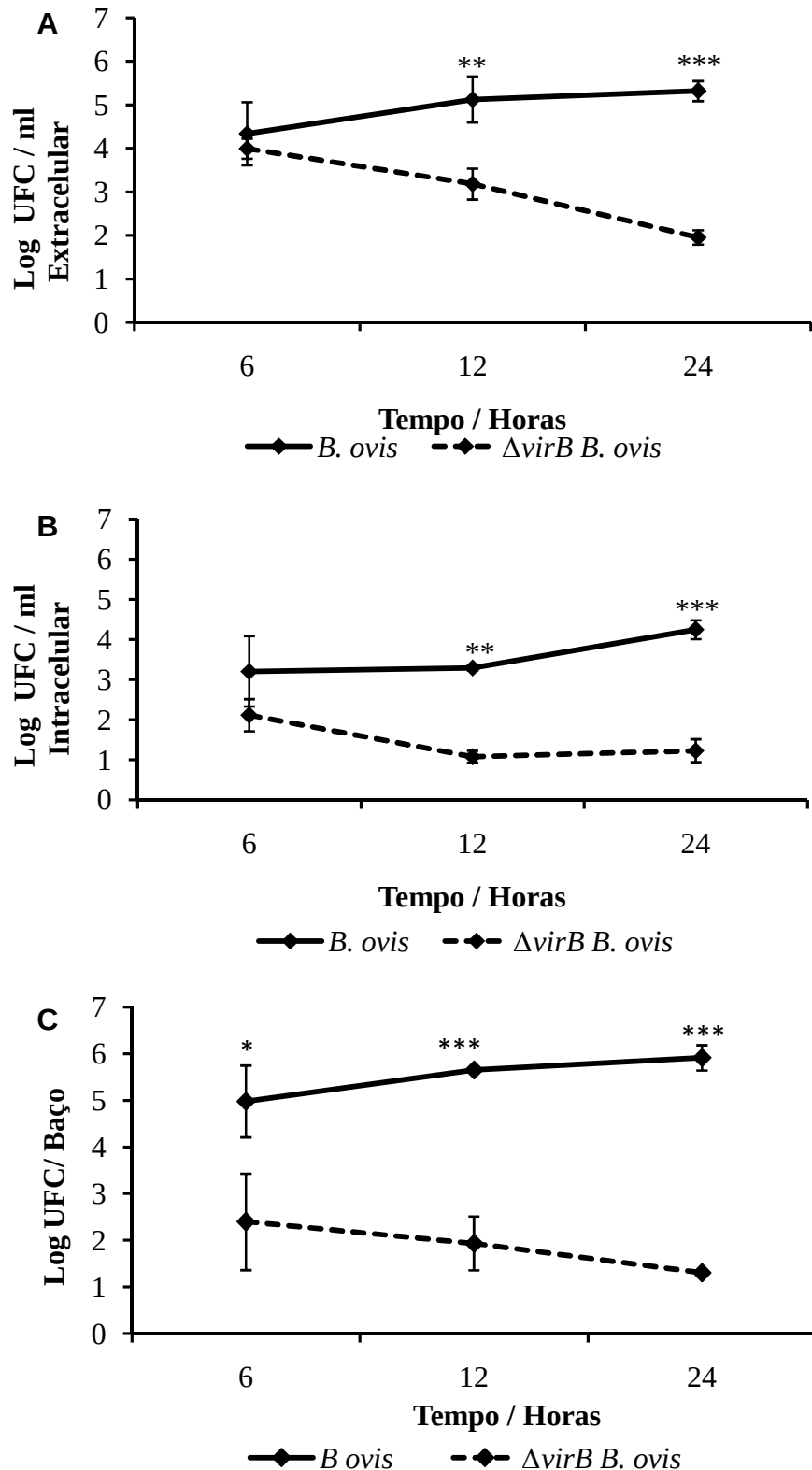


Figura 5. Cinética de infecção *in vivo* em camundongos Balb/c, com inoculação de aproximadamente 1×10^6 UFC/animal da amostra selvagem *B. ovis* e mutante $\Delta virB$ *B. ovis*, por via intraperitoneal. A capacidade de sobrevivência extracelular (A), replicação intracelular nos macrófagos peritoneais (B) e colonização esplênica (C) foram avaliadas nos tempos de 6, 12 e 24 h pós-infecção. A contagem de UFC foi submetida à transformação logarítmica, representando à média e desvio padrão de grupos de camundongos (n=4). Diferença significativa entre as amostras está indicada pelos asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). 59

Na infecção *in vivo*, também foi avaliado o potencial das amostras, selvagem (*B. ovis*) e mutante (*virB B. ovis*), promoverem infecção sistêmica, mediante a averiguação da colonização no baço nos tempos de 6, 12 e 24 h p.i. (Figura 5C). Desde o início da infecção (6 h p.i.), a amostra mutante já demonstrou colonização significativamente menor ($p < 0,05$), em comparação a amostra selvagem. Posteriormente (12 e 24 h p.i.), foi observado que somente a amostra selvagem foi capaz de sobreviver e replicar no baço, com aumento nos números de UFC ($p < 0,001$). Desta forma, fica evidenciado que o mutante *virB B. ovis* apresenta menor patogenicidade em camundongos Balb/c, do que a cepa selvagem, não conseguindo se replicar. Essa menor colonização esplênica pela amostra mutante é compatível com os resultados anteriores, que demonstraram o *virB B. ovis* sendo incapaz de sobreviver e multiplicar nos macrófagos peritoneais.

***B. abortus* e $\Delta virB B. abortus$ possuem semelhante cinética *in vivo* durante a fase inicial da infecção.**

As cepas selvagem e mutante, *B. abortus* e $\Delta virB B. abortus$, demonstraram nos tempos de 6, 12 e 24 h p.i., valores similares de UFC provenientes da recuperação peritoneal (Figura 6A). Não sendo observada também, diferença entre as amostras na capacidade de sobrevivência e multiplicação nos macrófagos peritoneais (Figura 6B), conseguindo ambas, manterem-se no ambiente intracelular, contudo não apresentando aumento superior a 1 log no número de UFC averiguadas durante o curso da infecção (6 às 24h).

Adicionalmente, foi avaliado durante o mesmo intervalo de tempo, a capacidade de ambas as amostras promoverem colonização no baço. Sendo observada, que a amostra parental e a mutante demonstraram até 24 h p.i. (Figura 6C), a mesma capacidade de sobrevivência e multiplicação neste órgão, demonstrando que o mutante $\Delta virB B. abortus$ apresenta uma cinética *in vivo* diferente do mutante $\Delta virB B. ovis$.

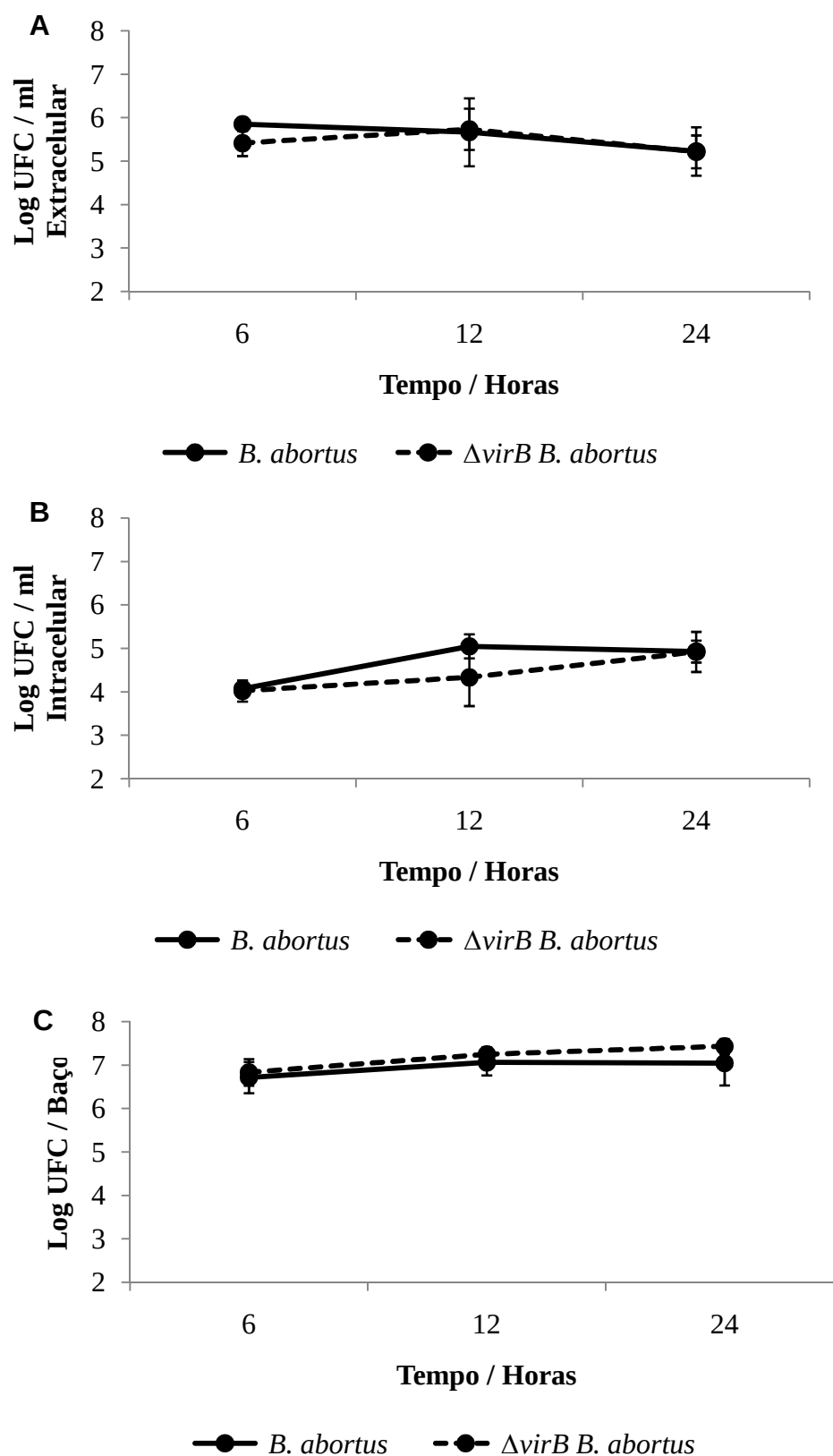


Figura 6. Cinética de infecção *in vivo*, com amostra parental de *B. abortus* e mutante $\Delta virB$ *B. abortus*, em camundongos Balb/c, via inoculação intraperitoneal de aproximadamente 1×10^6 UFC/animal. A capacidade de sobrevivência extracelular (A), replicação intracelular nos macrófagos peritoneais (B) e colonização esplênica (C) foram avaliadas nos tempos de 6, 12 e 24 h pós-infecção. A contagem de UFC foi submetida à transformação logarítmica, representando à média e desvio padrão de grupos de camundongos (n=4).

3 DISCUSSÃO

Estudos de crescimento *in vitro* de espécies de *Brucella*, avaliando a cinética de multiplicação entre as diferentes espécies, bem como comparando com amostras mutantes isogênicas são usualmente realizados em meio de cultura líquido, como o TSB (SUN et al., 2005; ZHONG et al., 2009). Isto ocorre, em virtude da melhor dispersão e homogeneidade das UFC no meio, sendo estimadas mediante análise de absorbância em espectrofotômetro, com subsequente plaqueamento e contagem em ágar. Contudo, a *B. ovis* não tem um crescimento quantificável em meio líquido sendo necessária a utilização de métodos não tradicionais para determinar a curva de crescimento desta espécie.

Gibby Irvin & Gibby Anna (1964) avaliaram as características de crescimento de *B. abortus* e *B. neotomae* em meio sólido (TSA), constatando em ambas as espécies, uma fase log no período de 8 às 18 horas, sendo que para a *B. abortus* o número de UFC continuou em crescimento exponencial até 72 horas, verificando neste tempo 5×10^{10} UFC/ml. Após este período, foi observado um declínio nas UFC, com $1,5 \times 10^{10}$ células/ml por volta de 96 h. Sun et al. (2005), avaliando também as condições de crescimento de *B. abortus*, contudo em meio líquido, constataram dados semelhantes, estando a fase de crescimento logarítmico desta espécie entre 8 e 20 h, tendo o início da fase estacionária entre 20 e 24 h após a incubação no meio.

A cinética de crescimento *in vitro* das amostras *B. ovis* e $\Delta virB$ *B. ovis*, em meio TSA suplementado com 10% de hemoglobina, desenvolvida neste experimento, demonstrou no período de 24 à 72 h, uma fase exponencial de crescimento, aumentando de aproximadamente 10^4 até 10^9 UFC/ml. Apresentando desta forma, um crescimento mais lento e tardio, com maior extensão da fase exponencial, quando comparado com a *B. abortus*. Adicionalmente, a amostra parental e a mutante *virB* apresentaram perfil de crescimento semelhante, o que corrobora com o estudo previamente realizado por Zhong et al. (2009), com amostras de *B. melitensis* (BM) e mutante BM-VIR, super-expressando o operon *virB*, que demonstraram curva de

crescimento similar em meio TSB, sendo a fase exponencial o intervalo de 10 às 20 h.

Pesquisas realizadas comparando amostras isogênicas, parental e mutante, fundamentam-se na avaliação da capacidade de crescimento das amostras sob as mesmas condições, no intuito de verificar se a mutação não inviabilizou o crescimento, sendo imprescindível para posterior uso da amostra mutante em experimentos de infecção *in vitro* e *in vivo*.

Diversos estudos sobre a capacidade de internalização, sobrevivência, multiplicação e resposta imunológica frente à infecção com agentes patogênicos, como a *Brucella*, são realizados mediante a utilização de cultivos celulares (ROLAN & TSOLIS, 2007; MARTÍN-MARTÍN et al., 2010; COVERT et al., 2009; FERRERO et al., 2009; RÓLAN et al., 2009; CARVALHO NETA et al., 2008), sendo esta alternativa de extrema importância para a elucidação e melhor compreensão da patogênese durante as infecções.

De modo particular, a *Brucella* não apresenta fatores clássicos de virulência (MORENO & MORIYON, 2001), fazendo uso de outros mecanismos para permanecer no ambiente intracelular, alcançar o nicho de multiplicação e escapar da resposta imunológica do hospedeiro.

Dentre os vários mecanismos relacionados à virulência já descritos, o LPS (JIMÉNEZ de BAGÜÉS et al., 2004; LAPAQUE et al., 2005; SELEEM et al., 2009) e o sistema de secreção do tipo IV (SST4) (BOSCHIROLI et al., 2002; GORVEL & MORENO, 2002; KO & SPLITTER, 2003; CELLI et al., 2003; CELLI, 2006) são bastante importantes para a sobrevivência e multiplicação da *Brucella*.

O LPS, por a ação da cadeia O, demonstrou ser imprescindível na sobrevivência inicial extracelular, sendo as amostras rugosas, não detentoras da cadeia O, mais susceptíveis a ação de complementos e peptídeos antimicrobianos (LAPAQUE et al., 2005). O SST4 permite a *Brucella* escapar da fusão com o lisossomo e alcançar o nicho de replicação intracelular (GORVEL & MORENO, 2002; CELLI et al., 2003), sendo amplamente estudado nas espécies patogênicas como *B. abortus* (COMERCI et al., 2001; den HARTIGH et al., 2004; ROUX et al., 2007; RÓLAN & TSOLIS, 2007, 2008;

RÓLAN et al., 2009) e *B. melitensis* (PAIXÃO et al., 2009a; ZHONG et al., 2009; WANG et al., 2010).

Contudo, não existiam dados sobre a importância do SST4 nas espécies de LPS rugoso, como a *B. ovis*, que apesar de não apresentar potencial zoonótico (CORBEL, 1997), promove doença crônica nos ovinos (CARO-HERNANDÉZ et al., 2007), sendo um dos principais agentes associados à epididimite, diminuição na qualidade do sêmen e infertilidade nos machos, ocasionando assim perdas significativas na ovinocultura (CARPENTER et al., 1987; FICAPAL et al., 1998; SANTOS et al., 2005; LIRA & MEGID, 2009).

Ao avaliar o papel do SST4 na *B. ovis*, durante o processo de infecção *in vitro* e *in vivo* foi constatado que o mesmo não influencia no mecanismo de internalização, tendo à amostra parental e mutante $\Delta virB$ *B. ovis* a mesma capacidade de invasão. Perfil semelhante foi verificado entre as amostra de RB51 e *B. abortus*, com seus respectivos mutantes *virB*.

Entretanto, estudos de análise proteômica realizado por Wang et al. (2010) com *B. melitensis* e $\Delta virB$ *B. melitensis*, demonstraram que determinadas OMPs, como a Omp25/Omp31, estão diferentemente expressas em mutantes *virB*, implicando que o SST4 pode interferir nas propriedades da membrana externa e consequentemente na capacidade de internalização dessas bactérias. Mutantes $\Delta omp25$ e $\Delta omp22$ de *B. ovis* são incapazes de invadir células HeLa e tem internalização reduzida em macrófagos J774 (MARTÍN-MARTÍN et al., 2010).

Outro aspecto importante verificado no processo de invasão, foi que as amostras rugosas, RB51 e *B. ovis*, bem como os mutantes $\Delta virB$ RB51 e $\Delta virB$ *B. ovis*, apresentaram uma internalização em macrófagos Raw 264.7 mais acentuada, com diferença estatística significativa, em relação à amostra lisa de *B. abortus* e o mutante $\Delta virB$ *B. abortus*. Detilleux et al. (1990) relataram ter as formas rugosas um melhor potencial de fixação nas células do hospedeiro, contudo as lisas sendo mais eficientes na internalização. Estudos realizados por Jimenéz de Bagüés et al. (2004) constataram uma alta internalização de mutante rugosos em macrófagos J774. Este fato, segundo

Rittig et al. (2003) possivelmente ocorre devido a exposição de ligantes, que são ocultos pela cadeia O do LPS e, conseqüentemente aumentam a capacidade de aderência da *Brucella* aos macrófagos.

Pesquisas recentes realizadas por Ferrero et al. (2009), com células epiteliais humanas alveolares (A549) e bronquiais (Calu-6 e 16HBE14), demonstraram que as amostras rugosas, *B. canis* e, em especial a RB51, tiveram um maior percentual de internalização em relação a *B. abortus*, com significância $p < 0,001$, contudo somente a amostra lisa exibiu eficiente replicação nessas células.

Adicionalmente ao processo de internalização, foi avaliada a importância do SST4 durante a infecção pelas amostras *B. ovis* e mutante $\Delta virB$ *B. ovis*, em comparação a *B. abortus*. Verificando, de modo semelhante ao descrito na literatura para outras espécies de *Brucella*, que este sistema de secreção está diretamente relacionado com a capacidade de sobrevivência e multiplicação, visto que o mutante $\Delta virB$ *B. ovis* não consegue se multiplicar intracelularmente *in vitro* e *in vivo*, promovendo baixa colonização esplênica e estando atenuado 24 h após a infecção em camundongos.

Além disso, a amostra mutante de SST4 *B. ovis*, demonstrou 12 h p.i uma menor capacidade de sobrevivência no meio extracelular da cavidade peritoneal de camundongos, em relação à amostra parental de *B. ovis* e as amostras lisas, parental e mutante de *B. abortus*. Isto implica em uma maior susceptibilidade do mutante $\Delta virB$ *B. ovis* no meio extracelular e intracelular. A literatura relata que o LPS, mas especificamente a cadeia O, tem um importante papel na sobrevivência extracelular inicial da *Brucella*, devido ao bloqueio da via alternativa de complemento, sendo as amostras rugosas mais susceptíveis a ação do complemento e antimicrobianos (LAPAQUE et al., 2005). Todavia, fato adicional além da cadeia O, deve estar relacionado com a sobrevivência das amostras rugosas, uma vez que, a amostra parental de *B. ovis* conseguiu sobreviver neste ambiente, implicando que o SST4 possa ter também um papel importante na sobrevivência extracelular desta espécie.

Modelos murinos são usualmente utilizados na compreensão da patogênese de agentes infecciosos, sendo a linhagem Balb/c umas das mais

utilizadas no estudo da brucelose (ENRIGHT et al., 1990; den HARTIGH, et al., 2004; ROUX et al., 2007; PAIXÃO et al., 2009a; SILVA et al., 2011).

den Hartigh et al. (2004) desenvolveram um estudo com mutantes *virB1* e *virB2* de *B. abortus*, infectando camundongos Balb/c e a linhagem celular de macrófagos J774. Observando que os dois genes foram importantes para a replicação intracelular *in vitro*, estando os mutantes com menor número de UFC e diferença estatística significativa, $p < 0,05$, em relação a amostra parental, 24h após a infecção. Resultados estes, que corroboram com os obtidos nesta pesquisa, mediante infecção em macrófagos Raw 264.7, onde os mutantes $\Delta virB2$ *B. abortus* e $\Delta virB2$ *B. ovis*, também demonstraram diferença significativa das respectivas amostras parenterais a partir das 24 h p.i. Portanto, o SST4 é essencial para sobrevivência e replicação intracelular de amostras lisa e rugosa de *Brucella*. Além disso, os autores supracitados, verificaram que o gene *virB2*, diferentemente do *virB1*, é requerido para persistência da infecção de *B. abortus* em camundongos Balb/c.

Estudos realizados com *B. melitensis* e $\Delta virB$ *B. melitensis*, avaliando a cinética de infecção em macrófagos J774, demonstraram resultados semelhantes aos previamente abordados, onde a amostra mutante apresentou perda da capacidade de sobrevivência, com diferença significativa de aproximadamente 3 log em relação a parental após 24 h de infecção (ZHONG, et al., 2009).

Um ponto importante, observado na presente pesquisa foi o perfil da infecção *in vivo* das amostras rugosas (*B. ovis* e RB51) serem diferentes da amostra lisa de *B. abortus*, visto que, na lisa o mutante *virB* demonstrou a mesma cinética de infecção e patogenicidade da amostra parental, durante todo o curso da infecção avaliado, que foi de 6 a 24 h p.i. Fato este, também verificado em outros experimentos, como o desenvolvido por Rólan & Tsolis (2007), sob infecção intraperitoneal de camundongos Balb/c, com amostras parental e mutante *virB* de *B. abortus*. No qual foi observado, mediante a avaliação bacteriológica no baço, que o número de UFC não diferiu entre as amostras até 3 dias após a infecção, apresentando ambas aproximadamente

10^7 UFC/ml. Verificando somente uma diferença entre a amostra parental e mutante, não superior a 1 log, aos 7 dias p. i., sugerindo assim, que o mutante *virB* é inicialmente capaz de promover uma colonização com níveis similares a amostra parental no baço.

De modo semelhante, estudos realizados posteriormente por Paixão et al. (2009a), com *B. melitensis* e $\Delta virB2$ *B. melitensis*, contudo mediante infecção via intragástrica em camundongos Balb/c, foi verificada que a amostra mutante apresentou diferença em relação a parental somente 7 dias após a infecção. Sendo demonstrado por esses resultados, que o SST4 não é requerido para uma colonização inicial, entretanto essencial para a persistência da infecção em camundongos por *B. abortus* e *B. melitensis*.

Contudo, neste trabalho foi verificado que para *B. ovis* a importância do SST4 está relacionada com a sobrevivência extracelular, bem como na capacidade de multiplicação intracelular e na colonização bacteriana esplênica, desde o início do processo de infecção em camundongos.

Resposta imunológica inicial à infecção por *Brucella*

A interação inicial entre a *Brucella* e as células alvos da infecção, como os macrófagos, trofoblastos e células dendríticas, pode influenciar no tipo de resposta desencadeada, de acordo com o perfil de citocinas liberadas durante a infecção (MURPHY et al., 2001; CELI et al., 2003; CARVALHO-NETA et al., 2008, 2010).

O sistema imunológico do hospedeiro, no intuito de controlar a ação do patógeno, utiliza mecanismos importantes inerentes à resposta inata e adaptativa. A imunidade inata atua na redução do número inicial do patógeno, sendo também importante no desencadeamento da resposta do tipo adaptativa (KO & SPLITTER, 2003). A resistência a patógenos bacterianos como a *Brucella* é dependente de uma resposta imune do tipo celular (Th1), que é mediada pela produção de quimiocinas e citocinas, que ativam macrófagos, linfócitos e outros efetores da imunidade inata ou adaptativa, otimizando assim, a capacidade de eliminação do patógeno (JANEWAY et al., 2001).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi quantificar a expressão gênica de determinadas quimiocinas e citocinas (KC, MIP-2, MIP-1 β , IL-6 e IL-10) em camundongos infectados com *B. ovis*, $\Delta virB$ *B. ovis*, *B. abortus* e $\Delta virB$ *B. abortus*, avaliando a resposta pró-inflamatória gerada. Correlacionando esses dados, com as observações histológicas no baço e no fígado de camundongos infectados com *Brucella*, além de verificar a presença do patógeno nestes órgãos, através de imunohistoquímica.

1 MATERIAS E MÉTODOS

1.1 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Fragments de baço e fígado dos camundongos eutanasiados 24 pós-infecção foram colhidos e, colocados separadamente em cassetes histológicos devidamente identificados, fixados por 24h em formalina tamponada a 10% (formol 37%, 4% fosfato de sódio monobásico, 6,5% fosfato de sódio bibásico, água destilada). Os fragmentos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram realizados no micrótomo e colocados em lâminas, para posterior coloração em hematoxilina e eosina (HE) ou processamento imunohistoquímico em lâminas previamente silanizadas (3-aminopropyl triethoxysilane, Sigma Aldrich, EUA).

Para imunohistoquímica, cortes de baço foram processadas conforme previamente descrito (Xavier et al., 2009). Em resumo, após serem diafanizados e rehidratados, os cortes foram imersos por 20 minutos em solução bloqueadora de oxidação endógena, composta de peróxido de hidrogênio 10% e metanol, seguido de bloqueio em 25 mg/ml de leite desnatado por 45 minutos. Posteriormente, incubados por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente com seu respectivo anticorpo primário policlonal: *B. abortus* (diluição 1:1000) oriundo de coelhos experimentalmente imunizados com amostra vacinal B19 ou *B. ovis* (diluição 1:5000) oriundo de ovinos experimentalmente imunizados amostra ATCC 25840. Retirou-se o excesso do anticorpo primário com lavagens em PBS e os cortes foram submetidos a duas outras incubações de 20 minutos cada, com o anticorpo secundário biotinizado, seguido de lavagem em PBS e, depois com o reagente streptavidina-peroxidase (Kit LSAB2 System-HRP; Dako Corporation, Carpinteria, CA). A revelação da imunomarcção foi realizada com o

cromógeno diaminobenzidina (DAB, DAKO, EUA), contracorado com hematoxilina de Mayer.

1.2 EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL

Amostras de baço de camundongos infectados com *B. ovis*, $\Delta virB$ *B. ovis*, *B. abortus* e $\Delta virB$ *B. abortus*, eutanasiados 24 pós-infecção, foram devidamente coletadas e armazenadas em criotubos a -80°C, sendo submetidas à extração de RNA total, pelo método trizol (Invitrogen, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, foram adicionados 500 µl de trizol ao fragmento de tecido colhido, homogeneizando-o com auxílio de pistilo, adicionado mais 500 µl de trizol e, posteriormente incubando-o no gelo por 5 minutos. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio, seguida de agitação vigorosa no vórtex, incubação no gelo por 15 minutos e centrifugação a 12.000g, à 4°C, por 15 minutos. Logo após, foi observada a formação de 3 fases líquidas no tubo, sendo coletado aproximadamente 600 µl do sobrenadante para um novo tubo. Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol e os tubos invertidos vagarosamente, incubando-os em gelo por 10 minutos e centrifugando a 12.000g, à 4°C, por 10 minutos. Em seguida, o pellet de RNA total foi lavado com etanol a 75% e, centrifugado de 7.500g, à 4°C, por 5 minutos. Finalmente após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspendido em 30µl de água DEPC (*Diethylpyrocarbonate*), livre de DNase e RNase (Invitrogen, Brasil) e incubados em banho-maria por 10 minutos a 55°C, para completa dissolução. O RNA total foi armazenado a -80°C até a preparação do cDNA.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria (SmartspecTM300, BioRad, CA), com posterior padronização das amostras para concentração de 500ng/µl.

Para elaboração do cDNA foi utilizado o *SuperScriptTM first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil). O preparo da reação foi realizado de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante.

Resumidamente: 2,5 µl do mix de dNTP 10 mM; 2,5 µl de random hexamers (50 ng/µl) e 13 µl de água DEPC foram misturados e distribuídos em microtubos, com posterior adição de 5 µl do RNA extraído e incubação a 65°C por 5 minutos. Em seguida, preparou-se um segundo mix de reações contendo: 5 µl de RT buffer 10X; 10 µl MgCl₂ 25mM; 5 µl de DTT 0,1 M e 2,5 µl RNaseOUT (inibidor de ribonuclease) distribuindo após, 22,5 µl do mix por microtubo, incubando a 25°C por 2 minutos e adicionando 2,5 µl da enzima Superscript II RT. Ao fim, foram submetidos aos parâmetros para a transcrição reversa no termociclador (Nyxtechnik Amplitronyx A4, EUA): 25°C por 10 minutos (transcrição), 42°C por 50 minutos (extensão) e 70°C por 15 minutos (inativação da enzima). Após esta ciclagem, as amostras foram tratadas com 2,5 µl de RNase H, submetidas a novo ciclo de 37°C por 20 minutos e posterior armazenamento a -20°C.

A PCRq (quantitativo) foi realizada no aparelho SmartCycler system (Cepheid, EUA). A reação de 25 µl continha: 12,5 µL Syber Green; 1 µl de cada primer, senso e antisenso; 2,5 µl de cDNA e 8,0 µl de água DEPC. A programação da máquina foi realizada segundo a recomendação do fabricante para o fluoróculo Sybr Green ® (Invitrogen, Brasil), que consiste de incubação inicial a 50°C por 2 minutos e 95°C por mais 2 minutos, seguida de 40 ciclos, com temperaturas de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos.

Os resultados foram analisados através do método comparativo de Ct (*cycle threshold*) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A variação de expressão das citocinas foi calculada em relação ao grupo não infectado e os valores de Ct foram normalizados com base na expressão de GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase). Os genes avaliados e seus respectivos iniciadores utilizados neste estudo foram listados na Tabela 2.

Tabela 2. Genes e iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real.

GENE	SEQUÊNCIA (5' – 3')
GAPDH ¹	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
KC ²	TGCACCCAAACCGAAGTCAT TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC
MIP-2 ³	AGTGAAGTGCCTGTCAATGC AGGCAAACCTTTTGACCGCC
MIP-1β ⁴	ACCTCCCGGCAGCTTCACAGA GGTCAGGAATACCACAGCTGGCT
IL-6 ⁵	GAGGATACCACTCCCAACAGACC AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
IL-10 ⁶	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA ACCTGCTCCACTGCCTTGCT

¹Gliceraldeído fosfato desidrogenase; ² *Keratinocyte chemoattractant*; ³Proteína inflamatória de macrófagos 2; ⁴Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta; ⁵Interleucina-6; ⁶Interleucina-10.

1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relacionados à expressão gênica sofreram transformação logarítmica, sendo expressos em médias geométricas e desvio padrão, com posterior análise por ANOVA. As médias dos grupos avaliados foram comparadas pelo teste de T Student não pareado, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

2 RESULTADOS

2.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Ao avaliar, baço e fígado de camundongos infectados por 24 h com amostras de *B. ovis* ou $\Delta virB$ *B. ovis*, nenhuma alteração histológica (Figura 7) e imunomarcagem foi verificada para ambas as amostras. Portanto, não sendo detectada a presença do patógeno no início da infecção, apesar dos altos

níveis de colonização bacteriana esplênica nos animais infectados com a amostra parental. Contudo, correspondendo com os baixos números de UFC da amostra mutante, associado também a menor sensibilidade da imunohistoquímica para detecção deste patógeno em tecidos de camundongos como previamente descrito (MEADOR et al., 1986). Em relação aos animais infectados com amostras de *B. abortus* ou $\Delta virB$ *B. abortus* também não foram detectadas lesões teciduais e imunomarcação no início da infecção.

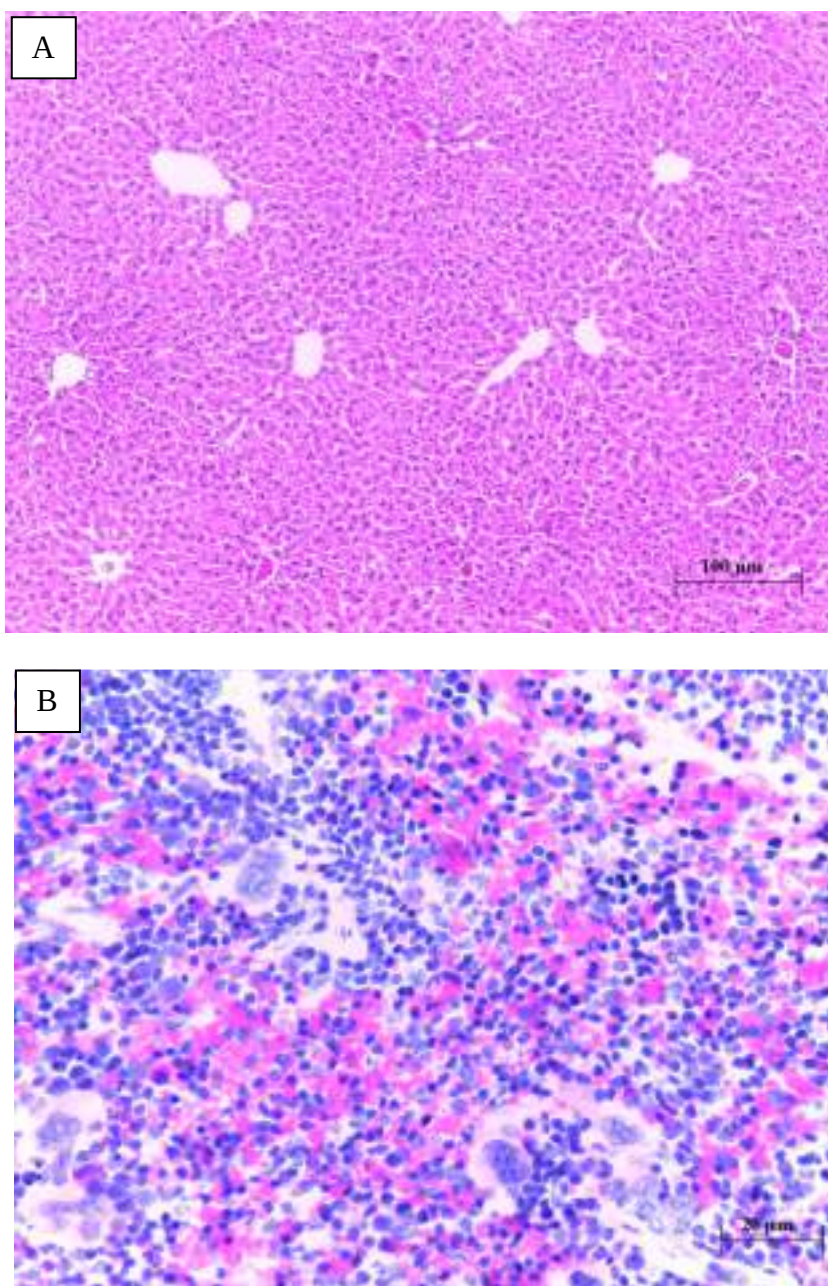


Figura 7. Fotomicrografia de fígado (A) e baço (B) de camundongos Balb/c, infectados por 24h, com cepas de *Brucella ovis*, 1×10^6 UFC/animal. Ausência de alterações histológicas significativas (HE).

2. EXPRESSÃO GÊNICA

Análises de RT-PCR em tempo real foram realizadas para investigar a expressão de quimiocinas (MIP-2, MIP-1 β e KC) e citocinas (IL-6 e IL-10) no início da infecção por *Brucella* spp.

Balc/c infectados com *B. ovis* demonstraram baixos níveis de expressão de MIP-2, MIP-1 β , KC, IL-6 e IL-10.

A expressão, 24 h.p.i., da quimiocina KC e da interleucina 6 (IL-6), teve diferença significativa entre as amostras de LPS liso e rugoso, apresentando os animais infectados com *B. abortus* maior expressão de KC e IL-6 em relação aos infectados com *B. ovis* (Figura 8). Fato semelhante foi observado ao comparar as amostras mutantes. Camundongos infectados com *B. abortus* tiveram aumento superior a 3 vezes (*fold change*) na amplitude da expressão de KC e 2 vezes (*fold change*) na expressão de IL-6 em relação aos infectados com *B. ovis*.

Níveis diferentes de expressão da proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 β) foram verificados entre os grupos de animais infectados com os mutantes $\Delta virB$ *B. abortus* e $\Delta virB$ *B. ovis*, tendo o grupo do mutante liso expressão superior de aproximadamente 1,5 vezes (*fold change*) em comparação ao grupo do mutante rugoso. Em relação aos níveis de expressão de MIP-2 e IL-10, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

Adicionalmente, ao comparar os níveis de expressão entre camundongos infectados com *B. ovis* e o grupo controle (animais não infectados), não foram observados aumento na expressão das quimiocinas (MIP-2, MIP-1 β e KC) e citocinas (IL-6 e IL-10) às 24 h.p.i. Além disso, ao confrontar os níveis de expressão da amostra parental e sua respectiva mutante *virB*, para *B. abortus* e *B. ovis*, não foi verificada nenhuma diferença estatística significativa para os genes avaliados.

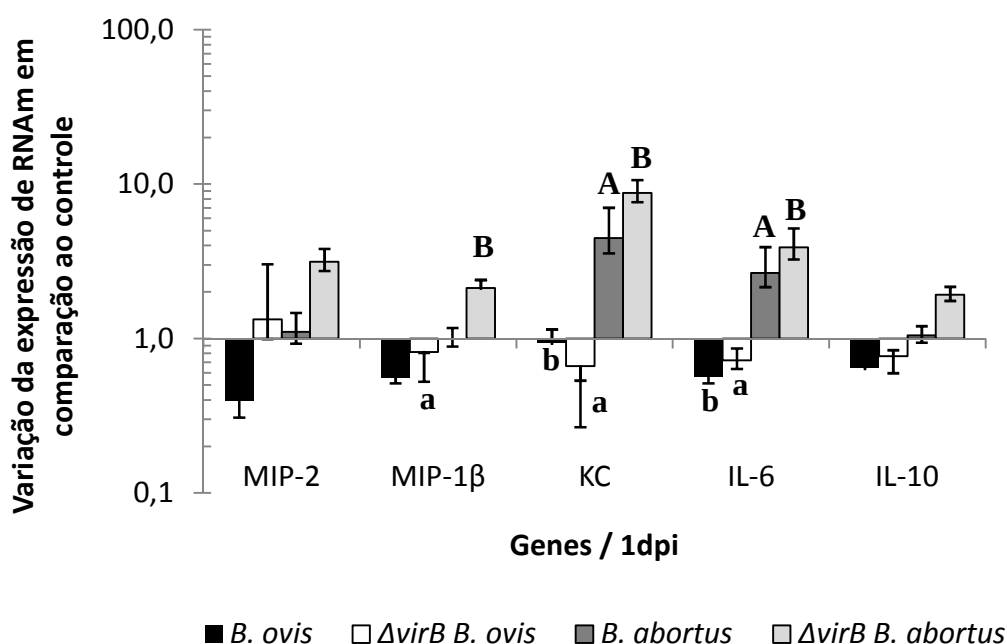


Figura 8. Expressão de RNAm de quimiocinas (MIP-2, MIP-1 β e KC) e citocinas (IL-6 e IL-10), no baço de camundongos Balb/c, 24 h pós-infecção por *Brucella* spp., através RT-PCR em tempo real. Resultados provenientes da comparação com o grupo controle, correspondente a animais não infectados (n=4), estando os dados representados por média geométrica e erro padrão. A diferença significativa entre os grupos está indicada por letras distintas (p<0,05).

3 DISCUSSÃO

Estudos prévios relatam a ocorrência de uma resposta neutrofílica em processos infecciosos ocasionados por *B. melitensis* e *B. abortus*, em fígado e baço de camundongos Balb/c (ENRIGHT et al., 1990; PAIXÃO et al., 2009a), e por *B. abortus* em tecidos placentários de bovino (PAIXÃO, 2006). Resposta semelhante de migração neutrofílica foi verificada em experimento in vitro, com linhagem celular HepG2 de hepatoma humano infectadas com *B. abortus* (DELPINO et al., 2010). Contudo, perfil diferenciado foi observado no trato gastrointestinal de camundongos infectados com *B. melitensis*, não sendo verificado nenhum processo inflamatório significativo com influxo de neutrófilos, além da ausência na expressão de KC e somente discreta expressão de MIP-2 no íleo (PAIXÃO, 2009a).

KC, MIP-2 e MIP-1 β atuam na quimiotaxia para polimorfonucleares, como os neutrófilos, sendo produzidas por macrófagos em resposta a infecção por vários agentes patogênicos (JENNER & YOUNG, 2005). Estas quimiocinas foram investigadas neste trabalho, onde KC e MIP-1 β demonstraram perfil de expressão diferenciada mediante o tipo de *Brucella* utilizada na infecção, tendo um aumento da expressão no grupo de camundongos infectados com *B. abortus*.

Os neutrófilos correspondem à primeira linha de defesa celular em infecções causadas por bactérias gram-negativas (KO & SPLITTER, 2003), sendo atraídos para o sítio da infecção por estímulos químicos oriundos ou derivados do patógeno, como por exemplo, a L-Omp19, uma lipoproteína da membrana externa de *B. abortus* que promove a migração e prolonga a sobrevivência dos neutrófilos (RIVERS et al., 2006; ZWERDLING et al., 2009). Estes leucócitos possuem atividade bactericida mediante a produção de radicais livres e lisozimas, cuja produção é induzida pelo lipídeo A e o LPS das bactérias (RASSOL et al., 1992). Contudo, essas células são consideradas de baixa eficiência no controle da *Brucella*, visto que, esta bactéria consegue sobreviver em seu interior, podendo servir o leucócito como carreador da bactéria para diversos órgãos, favorecendo a persistência da infecção (KO & SPLITTER, 2003; RIVERS et al., 2006).

Roux et al. (2007) analisaram a expressão de determinados genes em esplenócitos de camundongos infectados com amostras virulentas, *B. abortus* e *B. melitensis* e mutantes *virB*. Verificando através de análises de RT-PCR em tempo real, que vários genes aumentaram ou diminuíram a expressão mediante o processo infeccioso. Tendo um aumento da expressão de citocinas CXC, como a CXCL1 ou KC, durante os primeiros 3 dias após a infecção, que foi correlacionada com o influxo de neutrófilos no fígado, sendo após 7 dias substituída por uma inflamação granulomatosa. Outras citocinas também foram induzidas durante a infecção por *B. melitensis*, dentre elas, a CXCL-2 ou MIP-2 e CCL4 ou MIP-1 β . Contudo, não foi observado nos animais infectados com amostras mutantes *virB*, a expressão de genes pró-inflamatórios, demonstrando que o SST4 é requerido para desencadear esta resposta.

Todavia, apesar de estudos relatando a indução de citocinas pró-inflamatórias por *B. abortus* e recrutamento de leucócitos, alguns trabalhos têm demonstrado cinética de expressão diferente durante os estágios iniciais da infecção. Barquero-Calvo et al. (2007) relataram mediante estudo de resposta imune inata em camundongos infectados por *B. abortus*, que esta bactéria não induz resposta pró-inflamatória, com ausência de recrutamento de leucócitos e alterações celulares ou humorais na corrente sanguínea desses animais. Além disso, os pesquisadores compararam os resultados com os níveis de citocinas induzidos por *Salmonella typhimurium*, que de forma contrária a *Brucella*, onde os níveis são insignificantes, a *Salmonella* promove aumento na indução das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, no máximo até 10h p.i., bem como de IL-10, após 24h de inoculação. Em concordância com estes resultados, Carvalho-Neta et al. (2008, 2010) relata que a *B. abortus* é capaz de suprimir a resposta pró-inflamatória nas células trofoblásticas bovina e Paixão (2009a), mediante infecção experimental com *B. melitensis* em camundongos Balb/c não verificou o aumento da expressão de IL-6 e IL-10.

A ausência de lesões e imunodeteção do patógeno nos animais infectados por *B. ovis* e *B. abortus*, verificadas neste trabalho, pode ser em virtude do período de avaliação pós-infecção, que foi de 24 h. Visto que, estudos realizados por Silva et al. (2011), demonstraram imunomarcagem e discreto infiltrado neutrofílico no baço, fígado, epidídimo e vesícula seminal em camundongos Balb/c e C57BL/6, somente aos 7 dias após a infecção com amostra de *B. ovis*. Adicionalmente, verificou-se a presença de microgranulomas multifocais, composto predominante por macrófagos, no baço e fígado desses animais, também após 7d p.i.

Rólan et al. (2009), verificaram nas análises histológicas de baço de camundongos C57BL/6 e Igh6^{-/-}, infectados com amostras de *B. abortus* e mutantes *virB*, 21d p.i., a formação de microgranulomas e aumento da proporção volumétrica dos folículos linfóides, nos animais infectados com a amostra parental, em ambas as linhagens de camundongo. Não sendo observado alterações morfológicas no baço de camundongos infectados com o mutante *virB*. Adicionalmente, constataram que 3 dias após a infecção, ambas

as linhagens de camundongos apresentavam o mesmo perfil de expressão de determinadas citocinas, como KC, MIP-2 e IL-6, para as amostras parental e mutante *virB* de *B. abortus*. Fato este, também verificado neste estudo, onde não foi constatada nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$), entre as amostras, parental e sua respectiva mutante SST4, de *B. abortus* e *B. ovis*, no perfil de expressão das citocinas e quimiocinas analisadas.

CONCLUSÕES

- A internalização de amostras, lisa e rugosa de *Brucella*, não é influenciada pelo SST4;
- O SST4 é essencial para a sobrevivência e multiplicação intracelular da *Brucella*, apresentando as amostras, lisa e rugosa, cinética de infecção *in vitro* semelhante;
- A *B. abortus* e o mutante *virB B. abortus* possuem cinética de infecção *in vivo* semelhante, diferindo da amostra rugosa *B. ovis*;
- Nenhuma imunomarcacão e alteracão histológica foram observadas no início da infecção por *B. ovis*;
- Infecções com *B. ovis* demonstraram baixos níveis de expressão de MIP-2, MIP-1 β , KC, IL-6 e IL-10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, M. R; CHEVILLE, N. F.; DEYOE, B. L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. **Vet. Pathol.**, v. 25, p. 28-35, 1988.

ADAMS, L. G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. **Vet. Microbiol.**, v. 90, p. 553-561, 2002.

ALLEN, C. A.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A. Transposon derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1008-1016, 1998.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; et al. **Techniques for Brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1988.

ANDERSON, T. D., MEADOR, V. P., CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and Histologic Lesions. **Vet. Pathol.**, v. 23, p. 219-226, 1986.

ARELLANO-REYNOSO, B.; LAPAQUE, N.; et al. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. **Nat. Immunol.**, v.6, p.618-625, 2005.

BALDWIN, C. L.; JIANG, X.; FERNANDES, D. M. Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of cytokines and iron. **Trends Microbiol.**, v.1, p.99-104, 1993.

BARQUEIRO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D. S.; et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. **PLoS**, v. 7, p. 631, 2007.

BEER, J. **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1992.

BERTOTTO, A.; GERLI, R.; SPINOZZI, F.; et al. Lymphocytes bearing the $\gamma\delta$ T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. **Eur. J. Immunol.**, v.23, p.1177-1180, 1993.

BOHIN, J. P. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. **FEMS Microbiol Lett**, v. 186, p. 11-19, 2000.

BOLETIM, DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. **As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações**. Brasília, 1998.

BOSCHIROLI, M. L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; et al. Type IV secretion and *Brucella* virulence. **Vet. Microbiol.**, v.90, p.341-348, 2002.

BRASIL. **Instrução Normativa nº6 de 08 de janeiro de 2004**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2004.

BRASIL. **Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose – PNCEBT**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 190 p., 2006.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains B19 and RB51. **J. of Clin. Microbiol.**, v. 33, p.1640-1642, 1995.

BRIONES, G.; INON de IANNINO, N.; ROSET, M.; et al. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2 glucan mutant have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. **Infect. Immun.**, n. 69, p. 4528-4535, 2001.

BURGUESS, G. W. Ovine contagious edididymitis: a review. **Vet. Microbiol.**, v. 7, p. 551-575, 1982.

CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G.; SOWA, B. A. Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 41, p. 295-306, 1994.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **J. Infection.**, v. 45, p.122-127, 2002.

CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; et al. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microb. Cell. Fact.**, v. 5, p. 1-13, 2006.

CARO-HERNÁNDEZ, P.; FERNÁNDEZ-LAGO, L.; MIGUEL, M. J.; et al. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4050-4061, 2007.

CARVALHO NETA, A. V.; STYNEN, A. P.; PAIXAO, T. A.; et al. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. **Infect. Immun.**, v.76, p.1897-1907, 2008.

CARVALHO NETA, A. V.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Vet. J.**, v. 184, p.146-155, 2010.

CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K. A.; ESTEIN, S. M.; et al. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev 1 vaccination. **Vacc.**, v. 25, n. 32, p. 5958-5967, 2007.

CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M.; et al. *Brucella* evades macrophage killing via *VirB*-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. **J. Exp. Med.**, v.198, p.545-556, 2003.

CELI, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. **Res. Microbiol.**, v.157, p. 93-98, 2006.

CIRL, C.; WIESER, A.; YADAV, M.; et al. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. **Nat. Med.**, v.14, p.399-406, 2008.

COMERCI, D. J.; MARTINEZ-LORENZO, M. J.; SIEIRA, R.; et al. Essential role of the *VirB* machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. **Cell. Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 159-168, 2001.

CORBEIL, L. B.; BLAU, K.; INZANA, T. J.; et al. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 3251-3261, 1988.

CORBEL, M. J. **Brucella**. In: Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunology. 8 ed. London: Edward Arnold, p. 339-353, 1990.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, p.213-221, 1997.

CORBEL, M. J. Brucellosis in humans and animals. **World Health Organization**, 2006.

COVERT, J.; MATHISON, A. J.; ESKRA, L.; et al. *Brucella melitensis*, *B. neotomae* and *B. ovis* elicit common and distinctive macrophage defense transcriptional responses. **Exp. Biol. Med.**, v. 234, n. 12, p. 1450-1467, 2010.

DÁNASTASIO, R.; ZIPFELZ, B.; MOGGI-CECCHI, J.; et al. Possible Brucellosis in an Early Hominin Skeleton from Sterkfontein, South Africa. **Plos**, v. 4, p. e6439, 2009.

DE, B. K.; STAUFFER, L.; KOYLASS, M. S.; et al. Characterization of a novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 43-49, 2008.

de JONG, M.F.; SUN, Y. H.; den HARTIGH, A. B.; et al. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophage by the *Brucella* type IV secretion system. **Mol. Microbiol.**, v. 70, p. 1378-1396.

DELPINO, M. V.; BARRIONUEVO, P.; SCIAN, R. et al. *Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses. **J. Hepatol.**, v. 53, p. 145-154, 2010.

den HARTIGH, A. B.; SUN, Y. H.; SONDERVAN, D.; et al. Differential requirements for virB1 and virB2 during *Brucella abortus* infection. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5143-5149, 2004.

DETILLEUX, P. G.; DEYOE. B. L.; CHEVILLE, N. F. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in vero cells: fluorescence and electron microscopy. **Vet. Pathol.**, v. 27, p. 317-328, 1990.

DORNAND, J.; LAFONT, V.; OLIARO, J. Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human natural killercells through a contact-dependent mechanism. **Infect. Immun.**, v.72, p.2303-2311, 2004.

EISENSCHENK, F. C.; HOULE, J. J.; HOFFMANN, E. M. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. **Vet. Microbiol.**, v.68, p.235-244, 1999.

ELZER, P. H.; JACOBSON, R. H.; NIELSEN, K. H.; et al. BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted policlonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes. **Immunol. Lett.**, v. 42, p. 145-150, 1994.

ENRIGHT, F. M.; ARAYA, L. N.; ELZER, P. H. et al. Comparative histopatology in Balb/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 26, n. 2, p. 171-182, 1990.

ESKRA, L.; MATHISON, A.; SPLITTER, G. Microarray analysis of mRNA levels from Raw 264.7 macrophage infected with *Brucella abortus*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1125-1133, 2003.

FERNANDES, D. M.; BENSON, R.;BALDWIN, C. L. Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. **Infect. Immun.**, v.63, p.4029-33, 1995.

FERNANDEZ-PRADA, C. M.; ZELAZOWSKA, E. B.; NIKOLICH, M.; et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 71, p.2110-2119, 2003.

FERRERO, M. C.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Smooth *Brucella* strains invade and replicate in humanlung epithelial cells without inducing cell death. **Microb. Infect.**, v. 11, p. 476-483, 2009.

FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO, J. M. et al. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. **Small Rum. Res.**, v. 29, p 13-19, 1998.

FOSTER, G; MACMILLAN, A.P.; GODFROID, J.; et al. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Vet. Microbiol.**, v. 90, p. 563–580, 2002.

FREER, E.; MORENO, E.; MORIYÓN, I.; et al. *Brucella-Slaimonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 5867-5876, 1996.

GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. New York: Springer, 721 p., 2001.

GIBBY, IRVIN W.; GIBBY, ANNA M. Population dynamics of *Brucella* on solid media. **A. Microbiol.**, v. 12, n. 5, p. 442-446, 1964.

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

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

GUZMAN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; et al. The two-component system BvrR-BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of the outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rizhobiaceae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 19, p. 12375-12380, 2002.

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

HONG, P.C.; TSOLIS, R. M.; FICHT, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4102-4107, 2000.

JANEWAY, C. A. The T cell receptor as multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 645-674, 1992.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; et al. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 5 ed. New York: Garland publishing, 2001.

JENNER, R.G.; YOUNG, R.A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, p.281-294, 2005.

JIANG, X.; BALDWIN, C.L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. **Infect. Immun.**, v.61, p.124-134, 1993.

JIMENÉZ de BAGÜÉS, M. P.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; et al. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2429-2433, 2004.

KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clin. Microb. Rev.**, v. 16, p.65-78, 2003.

KOHLER S.; PORTE, F.; JUBIERMAURIN, V.; et al. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. **Vet. Microbiol.**, v.90, p.299-309, 2002.

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

LIRA, N. S. C.; MEGID, J. Patogenia da brucelose ovina. **Vet. e Zotec.**, v. 16, p. 280-289, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta Delta CT) Method. **Method.**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPEZ-GONI, I.; GUZMAN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; et al. Regulation of *Brucella* virulence by the two-componentsystem BvrR/BvrS. **Vet. Microbiol.**, v.90,p.329-339, 2002.

MAGALHÃES-NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 16, p. 75-79, 1996.

MARTÍN-MARTÍN, A. I.; VIZCAÍNO, N.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophage. **Microb. Infect.**, v. 12, p. 246-251, 2010.

MEADOR, V. P.; TABATABAL, L. B.; HAGEMOSER, W. A.; et al. Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 2147-2150, 1986.

MORENO, E.; MORIYON, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. **Pro. Nat. Acad. Sci.**, v.99, p.1-3, 2002.

NAORENI, A.; JOUY, N.; OUAHRANI-BETTACHE, J. P.; et al. *Brucella suis* impaired specific recognition of phagosomes by lysosome due to phagosomal membrane modifications. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 486-493, 2001.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v. 24, p. 69-95, 1980.

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 1210–1220, 1999.

OLIARO J.; DUDAL S.; LIAUTARD J.; et al. $\gamma\delta$ T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria *Brucella*. **J. Leukoc. Biol.**, v.77, p 652-660, 2005.

OLIVEIRA, S. C.; HARMS, J. S.; RECH, E. L.; et al. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 77-84, 1998.

OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. A. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. **Vet. Microbiol.**, v. 90, p.417-424, 2002.

OLIVEIRA, S. C.; DE OLIVEIRA, F. S.; MACEDO, G. C.; et al. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. **Microb. Infect.**, v.10, p.1005-1009, 2008.

PAIXÃO, T. A.; FERREIRA, C.; BORGES, A. M.; et al. Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 109, p. 37-42, 2006.

PAIXÃO, T. A.; ROUX, C. M.; DEN HARTIGH, A. B.; et al. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 4197-4208, 2009a.

PAIXÃO, T. A. P.; COSTA, E. A.; XAVIER, M. N.; et al. Innate immunity in brucellosis. **Res. Adv. In Infect. Immun.**, v. 1, p.21-37, 2009b.

PAOLICCHI, F. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesions genitais y repuesta immune antiespermática. **Rev. Med. Vet.**, v. 82, n. 2, p. 86-88, 2001.

PAPPAS, G.; PANAGOPOULOU, P.; CHISTOU, L.; et al. *Brucella* as a biological weapon. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 2229-2236, 2006.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. **Int. J. Antimicrob. Agent.**, v. 30S, p. 29-31, 2007.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, p.239-249, 2003.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. Brucelose em búfalos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, p.389-401, 2008.

PEI, J.; TURSE, J. E.; FICHT, T. A. Evidence of *Brucella abortus* OPS dictating uptake and restricting NF-kappaB activation in murine macrophages. **Microb. Infect.**, v.10, p.582-590, 2008.

PHILLIPS, M.; DEYOE, B. L.; CANNING, P. C. Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella* O-antigen. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p. 2158-2161, 1989.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 90, p. 55-62, 2002.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 47, p. 13-29, 2005.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; et al. Estudo de prevalência da brucelose bovina no âmbito Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.**, v.61, supl.1, p.1-5, 2009.

PORTE, F. A.; NAROENI, A.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in innibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophage. **Infect. Immun.**, v. 71, p.1481-1490, 2003.

QIN, Q. M.; PEI, J.; ANCONA, V.; et al. Rnai screen of endoplasmatic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1 alpha in supporting *Brucella* replication. **PLoS Pathog.**, v. 4, p. 1000110, 2008.

RAJASHEKARA, G.; GLASNER, J. D.; GLOVER, D. A.; et al. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 15, p. 5040-5051, 2004.

RAMOS, A. A.; MIES FILHO, A.; SCHENK, J. A. P.; et al. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 1, p. 211-213, 1966.

RASOOL, O.; FREER, E.; MORENO, E.; et al. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1699-1702, 1992.

RIDLER, A. L.; WEST, D. M.; STAFFORD, K. J.; et al. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. **New Zealand Vet. J.**, v. 48, p. 57-59, 2000.

RILEY, L. K.; ROBERTSON, D. C. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 224-230, 1984.

RITTIG, M. G.; KAUFMANN, A.; ROBINS, A.; et al. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. **J. Leuk. Biol.**, v. 74, p. 1045-1055, 2003.

RIVERS, R. E.; ANDREWS, A.; GONZALEZ-SMITH, G.; et al. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. **Arch. Med. Vet.**, v. 38, p. 7-18, 2006.

ROBERTSON, M. Innate Immunity. **Curr. Biol.**, v. 8, p. 595-597, 1998.

ROLAN, H. G.; TSOLIS, R. M. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus virB* mutant colonization. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 2965-2973, 2007.

ROLAN, H. G.; TSOLIS, R. M. Inactivation of the Type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to *Brucella abortus* infection. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3207-3213, 2008.

ROLÁN, H. G.; XAVIER, M. N.; SANTOS, R. L.; et al. Natural antibody contributes to host defense against an attenuated *Brucella abortus virB* mutant. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 3004-3013, 2009.

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

ROUX, C. M.; ROLÁN, H. G.; SANTOS, R. L.; et al. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p.1851-1869, 2007.

SALCEDO, S. P.; MARCHESINI, M. I.; LELOUARD, H.; et al. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein BTP1. **PLoS Pathog.**, v.4, p.1-16, 2008.

SANTOS, R. L.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P. Infecção por *Brucella ovis*. **Cad. Tec. Vet. Zootec.**, v. 47, p. 42-56, 2005.

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

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58, p. 375–382, 2008.

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

SCHURIG, G. G.; ROOP, R. M.; BAGCHI, T.; et al. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Vet. Microbiol.**, v. 28, p. 171–188, 1991

SELEEM, M. N.; BOYLE, M. S.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, 392-398, 2009.

SERGEANT, E. S. G. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. **New Zealand Vet. J.**, v. 42, p. 97-100, 1994.

SIEIRA, R.; COMERCI, D. J.; SANCHEZ, D. O.; et al. A homologue of na operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 4849-4855, 2000.

SILVA, T. M. A.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, E. A.; et al. Putative ATP-Binding Cassette Transporter is Essential for *Brucella ovis* Pathogenesis in Mice. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 1706-1717, 2011.

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

SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GRILÓ, M. J.; et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 01, p. 125-138, 1998.

SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S. C.; CAREY, M.; et al. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 54, p. 309-319, 1996.

SRIRANGANATHAN, N.; SELEEM, M. N.; OLSEN, S. C.; et al. Genome mapping and genomics in animal-associated microbes. In: **Brucella**, Springer (Chapter 1), 2010.

STINAVAGE, P.; MARTIN, L. E.; SPITZNAGEL, J. K. O antigen and lipid A phosphoryl groups in resistance of *Salmonella typhimurium* LT-2 to non-oxidative killing in human polymorphonuclear neutrophils. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3894-3900, 1989.

SUN, Y. H. ; DEN HARTIGH, A. B.; SANTOS, R. L. et al. *virB* mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophage is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophage. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4826-4832, 2002.

SZYFRES. H.; CHAPPEL, R. Bacteriological confirmation of contagious epididymitis in rams in Argentina. **Rev. Fac. Cien. Vet.**, 3: 405-409, 1961.

TAM, R.; SAIER JR, M. H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 320-346, 1993.

TILLER, R. V.; GEE, J. E.; LONSWAY, D. R.; et al. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year old patient with chronic destructive pneumonia. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 23, 2010.

TSOLIS, R. M.; SECHADRI, R.; SANTOS, R. L.; et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. **Plos one**, v. 4, n. 5, p. 1-9, 2009.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **J. Mol. Med.**, v. 84, p. 712-725, 2006.

UZUREAU, S.; GODEFROID, M.; DESCHAMPS, C.; et al. Mutations of the quorum sensing dependent regulator Vjbr lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 6035-6047, 2007.

VAN RENSBURG, S. W. J.; VAN HEEDEN, K. M.; LE ROUX, D. J.; et al. Infectious infertility in rams. **J. South African Vet. Med. Assoc.**, v. 29, p. 223-233, 1958.

VELASCO, J.; BENGOCHEA, J. A.; GONZALES, D.; MORENO E. *Brucella abortus* and its closed phylogenetic relative *Ochrobacterum* spp. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3210-3218, 2000.

VERGER, J. M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 35, p. 292-295, 1985.

VIALA, J.; CHAPUT, C.; BONECA, I. G.; et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1166-1174, 2004.

WANG, Y.; CHEN, Z.; QIAO, F.; et al. The type IV secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 300, p. 92-100, 2010.

WATARAI, M.; MAKINO, S.; FUJII, Y.; et al. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. **Cell. Microbiol.**, v. 4, p. 341-355, 2002.

XAVIER, M. N.; SILVA, T. M. A.; COSTA, E. A. et al. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. **Vet. Microbiol.**, 2010.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; et al. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **J. Comp. Pathol.**, v. 140, p. 149-157, 2009.

YOUNG, E. J. N. Overview of human brucellosis. **Clinic. Infect. Dise.**, v. 21, p. 283-290, 1995.

ZHAN, Y.; LIU, Z.; CHEERS, C. Tumornecrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. **Infect. Immun.**, v.64, p.2782-2786, 1996.

ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophage. **Curr. Protoc. Immunol.**, chap. 14, unit. 14.1, 2008.

ZHONG, Z.; WANG, Y.; QIAO, F.; et al. Cytotoxicity of *Brucella* smooth strains for macrophage is mediated by increased secretion of the type IV secretion system. **Microbiol.**, v. 155, p. 3392-3402, 2009.

ZWERDLING, A.; DELPINO, M. V.; PASQUEVICH, K. A.; et al. *Brucella abortus* activates human neutrophils. **Microb. Infect.**, v. 11, p. 689-697, 2009.

ZYGMUNT, M.; BLASCO, J. M.; LETESSON, J. J.; et al. DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked difference in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 92, p. 1-13, 2009.