

Tatiane Alves da Paixão

Modelo de infecção gastrintestinal e o papel do
LPS, urease e sistema de secreção do tipo 4 da
Brucella melitensis em camundongos

Tese apresentada à UFMG, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal
com ênfase em Patologia Animal.
Orientador: Renato de Lima Santos

Belo Horizonte
UFMG-EV
2009

Tese defendida e aprovada em 16 de abril de 2009, pela comissão examinadora:

Prof. Renato de Lima Santos
(Orientador)

Profa. Alcina Vieira de Carvalho Neta

Dra. Érica Azevedo Costa

Prof. Ernane Fagundes do Nascimento

Prof. Marcos Bryan Heinemann

Aos meus pais

“É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais.”
Coelho Neto

“Ao expandirmos o campo do conhecimento apenas aumentamos o horizonte
da ignorância.”
Henry Miller

Agradecimentos

Deus, obrigado por sempre guiar meus passos.

Ao Professor Renato de Lima Santos pela oportunidade. Depois de um longo período de convivência, eu saio satisfeita por ter conhecido um grande professor, mestre e cientista, mas o mais importante, é que saio com a alegria de ter feito um amigo.

À Dra. Renee Tsois por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório em UC-Davis, etapa fundamental para minha experiência profissional e pessoal.

Ao Professores Andrey P. Lage, Roberto M. Guedes e Renee Tsois por participarem do meu comitê de orientação.

Aos professores do setor de Patologia da Escola de Veterinária, personagens importantes na minha formação profissional.

Aos amigos, colegas e funcionários do setor de Patologia da Escola de Veterinária, pela ajuda nos trabalhos laboratoriais, por momentos agradáveis ou simples palavras de incentivo que aliviam a aspereza do dia-dia.

Aos colegas dos laboratórios de *Brucella* e de *Salmonella* em UC-Davis pela acolhida, paciência e amizade dedicadas a mim durante minha estadia.

À minha família e amigos, que foram sempre o meu suporte nos momentos de vitória ou de fracasso. Em especial a minha amiga Silvia, que mesmo a distância foi sempre presente.

À Escola de Veterinária da UFMG, instituição onde me tornei uma profissional capacitada.

Ao *Department of Medical Microbiology and Immunology* UC-Davis por ter me recebido durante minha Bolsa de Doutorado Sanduíche.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - por conceder as bolsas de estudo, nacional e de doutorado sanduíche.

SUMÁRIO	
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1: BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	
Características gerais de infecção por <i>Brucella</i> spp	16
Infecção por <i>Brucella melitensis</i>	16
Patogênese molecular da brucelose	18
Resposta imunológica inata à brucelose	22
Camundongo como modelo animal de infecção por <i>Brucella</i>	27
CAPÍTULO 2: CINÉTICA DE INFECCÃO POR B. MELITENSIS PELO TRATO DIGESTIVO	
Objetivos	30
Material e métodos	30
Resultados	32
Discussão	39
CAPÍTULO 3: REQUERIMENTO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA: UREASE, LPS E SST4 DURANTE INFECCÃO POR B. MELITENSIS PELO TRATO DIGESTIVO.	
Objetivos	41
Material e métodos	41
Resultados	44
Discussão	49
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cinética da infecção por *Brucella melitensis* em camundongos pelo trato digestivo. Fragmentos de íleo, cólon, ceco, placas de Peyer (PP), linfonodo mesentérico (LM) baço e fígado foram homogeneizados em PBS e plaqueados para contagem bacteriana aos 0,3, 1, 3, 7, 14 e 21 dpi. 34
- Figura 2.** Expressão de RNAm de genes pró-inflamatórios no baço de camundongos infectados com *Brucella melitensis* aos 7, 14 e 21 dpi em comparação a animais controles não infectados medido pelo RT-PCR em tempo real. 36
- Figura 3.** Expressão de RNAm de genes pró-inflamatórios no íleo de camundongos infectados com *Brucella melitensis* aos 1, 3 e 7 dpi em comparação a animais controles não infectados medido pelo RT-PCR em tempo real. 36
- Figura 4:** Fotomicrografia de órgãos de camundongos infectados com *Brucella melitensis* aos 21 dias de infecção. Íleo (A) e cólon (B) sem alterações histológicas significativas. Baço (D) com múltiplos microgranulomas na polpa branca. Fígado com microgranuloma focal constituído predominantemente de macrófagos e poucos neutrófilos. 37
- Figura 5:** *Southern blot* para confirmação do mutante BM Δ ure1. Colônias selecionadas C1, C2, C4 e C5 foram confirmadas como mutantes. A amostra C4 foi amostra mutante utilizada nos experimentos. 44
- Figura 6:** *Southern blot* para confirmação do mutante BM Δ virB2. Todas as cinco colônias selecionadas (C1 a C5) foram confirmadas como mutantes. A amostra C1 foi amostra mutante utilizada nos experimentos. 44
- Figura 7:** Contagem bacteriana de *Brucella melitensis* em tecidos de camundongos infectados intragastricamente com *B. melitensis* amostra 16M ou amostras mutantes. Fragmentos de íleo, linfonodo mesentérico (LM), baço, fígado foram homogeneizados em PBS e plaqueados para contagem de UFC aos 1dpi (A) e 7 dpi (B). 45
- Figura 8.** Contagem bacteriana em tecidos de camundongos infectados intragastricamente com suspensão mista (1:1) de *Brucella melitensis* amostra 16M e amostras mutante como indicado. Fragmentos de íleo, linfonodo mesentérico (LM), baço, fígado foram homogeneizados em PBS e plaqueados para contagem de UFC aos 1dpi e 7 dpi. Os gráficos A, C e E representam as médias aritméticas e o erro padrão e B, D e F indicam o índice de competitividade da infecção mista, calculada no log (UFC da amostra mutante/UFC da 16M) ajustado para a mesma razão do inóculo. 46
-

LISTA DE FIGURAS

- Figura 9.** Análise da sobrevivência da *Brucella melitensis* 16M e amostras mutantes a pH 7,4 e 2 após 30 minutos a 37°C. As soluções contendo bactéria foram diluídas e plaqueadas para contagem de UFC. Os resultados estão representados por média aritmética e desvio padrão de dois experimentos independentes. 47
- Figura 10.** Análise da sobrevivência da *Brucella melitensis* 16M e amostras mutantes a soluções de 5% ou 10% de sais biliares (bile bovina) após 18 horas sob agitação a 37°C. As soluções contendo bactéria foram diluídas e plaqueadas para contagem de UFC. Os resultados estão representados por média aritmética e desvio padrão de três experimentos independentes. 47
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Iniciadores usados no RT-PCR quantitativo. 32
- Tabela 2.** Média e desvio padrão da contagem bacteriana em órgãos de camundongos infectados com 10^{10} UFC de *B. melitensis* 16M com ou sem a pré-administração de 10% NaHCO_3 . 33
- Tabela 3.** Número de animais positivos à bacteriologia do sangue, linfonodos cervicais superficiais (LC) e axilares (LA) de camundongos infectados intragastricamente com *Brucella melitensis* (n=5). 35
- Tabela 4.** Lista das amostras de bactéria, plasmídeos e iniciadores usados no experimento. 41
-

LISTA DE ABREVEATURAS

Btp1	<i>Brucella Tir protein 1</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GAPDH	Gliceraldeído Fosfato Dehidrogenase
HKBA	<i>B. abortus</i> morta pelo calor
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
KC	Quimioquinas de Neutrófilos
LA	Linfonodo axilar
LC	Linfonodo cervical
LM	Linfonodo mesentérico
LPS	Lipopolissacarideo
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo 2
MIP-	Proteína Inflamatória de Macrófagos
MyD88	Fator de diferenciação mileóide 88
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NF-κB	Fator nuclear de cadeia leve kappa favorecedor de células B ativadas
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
OMPs	proteínas de membrana externa
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>pmm</i>	<i>phosphomanomutase</i>
PP	Placas de Peyer
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
Rcb3	receptor de complemento
RFC	receptores da porção Fc de anticorpo
RNA	Ácido ribonucleico
ROI	Reativos intermediários de oxigênio
RT-PCR	Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
SST4	Sistema de Secreção do Tipo 4
TcpB	<i>TIR domain-containing protein of Brucella</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TNFα	Fator de Necrose Tumoral
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia

RESUMO

A brucelose humana é causada principalmente pela infecção por *Brucella melitensis* adquirida frequentemente através da ingestão de leite e produtos derivados de cabra ou ovelhas. Fatores de virulência bacterianos requeridos durante a infecção oral por *B. melitensis* são pouco investigados. Neste estudo, um modelo de infecção gastrointestinal em camundongo foi desenvolvido para verificar o papel da urease, do sistema de secreção do tipo 4 (SST4) e do lipopolissacarídeo (LPS) no estabelecimento da infecção por *B. melitensis*. Camundongos BALB/c fêmeas foram inoculados intragastricamente por sonda gástrica com 1×10^{10} UFC de amostra virulenta de *B. melitensis* 16M ou amostras mutantes, sendo que fragmentos de órgãos foram coletados para bacteriologia. *B. melitensis* 16M foi consistentemente isolada de linfonodo mesentérico, baço e fígado a partir do 3º ou 7º dpi. Ocorreu diminuição marcante e progressiva no número de UFC no intestino até 21 dpi. Nenhuma lesão inflamatória foi observada no íleo ou cólon durante a infecção. Amostras mutantes carreando deleção da subunidade $\alpha\beta\gamma$ do *ureI* operon, deleção do *virB2*, ou deleção do *pmm* foram construídos e comparadas com amostra virulenta 16M. O mutante $\Delta ureI$ foi atenuado no baço ($p < 0,05$). Já os mutantes $\Delta virB2$ e Δpmm foram atenuados no baço ($p < 0,05$) e linfonodo mesentérico ($p < 0,001$). Amostra virulenta e amostras mutantes tiveram resistência semelhante em baixo pH e sais biliares sugerindo que a reduzida colonização pelos mutantes não foi resultado de resistência reduzida a pH ácido e a sais biliares. Os resultados indicam que urease, SST4 e LPS são requeridos para infecção de *B. melitensis* via trato digestivo.

Palavras-chave: *Brucella melitensis*, modelo murino, infecção gastrointestinal, fatores de virulência.

ABSTRACT

Human brucellosis is caused mainly by *Brucella melitensis*, which is often acquired by ingesting contaminated goat or sheep milk and cheese. Bacterial factors required for oral infection by *B. melitensis* are poorly understood. In this study, a mouse model of gastrointestinal infection was developed to assess the roles of the urease, type IV secretion system (T4SS), and lipopolysaccharide (LPS) for establishing infection through the digestive tract. Female BALB/c mice were inoculated intragastrically by gavage with 1×10^{10} CFU of wild type *B. melitensis* strain 16M or mutant strains. Tissue samples were collected for CFU counting. *B. melitensis* 16M was consistently recovered from the mesenteric lymph node, spleen, and liver beginning at 3 or 7 dpi. In the gut, a marked decline of CFU numbers was observed up to 21 dpi. No inflammatory lesions were observed in ileum or colon during infection. Mutant strains carrying deletion of the urease subunits $\alpha\beta\gamma$ protein of the *ure1* operon, deletion of *virB2*, or deletion of *pmm* were constructed and compared at wild type strain. $\Delta ure1$ mutant was attenuated in the spleen ($p < 0.05$) whereas $\Delta virB2$, and Δpmm mutants were attenuated in the spleen ($p < 0.05$) and mesenteric lymph node ($p < 0.001$). Wild type and mutant strains had similar resistance to low pH and 5 or 10% bile suggesting that the reduced colonization of mutants was not the result of reduced resistance to acid pH or bile salts. These results indicate that urease, T4SS and LPS are required for wild type infection levels of *B. melitensis* through the digestive tract.

Keywords: *Brucella melitensis*, gastrointestinal infection, murine model, virulence factors.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Brucella* são patógenos gram-negativos, intracelulares facultativos que causam infecção crônica em hospedeiros mamíferos. *Brucella melitensis* infecta principalmente caprinos e ovinos causando transtornos reprodutivos e é considerada a espécie de *Brucella* mais patogênica ao homem (Corbel, 1997). A brucelose humana é uma zoonose importante de distribuição mundial que causa impacto econômico e social com mais de meio milhão de novos casos da doença registrados anualmente. Além de causar efeitos impactantes na saúde pública como custos elevados com tratamento e incapacitação para trabalho, a brucelose nos animais domésticos representa perda econômica devido queda na produção e custos com sanidade animal (Nielsen e Duncan, 1990; Godfroid et al., 2005; Pappas et al., 2006b).

A brucelose humana está associada à febre intermitente, anorexia, fraqueza, dores e inflamação afetando diversos órgãos. Espondilites, artrites, osteomielites e epididimo-orquites são manifestações comuns da infecção no homem. A infecção no coração e no encéfalo também ocorre, frequentemente resultando em morte (Mantur et al., 2007). Brucelose humana causada pela *B. melitensis* é principalmente devido à ingestão de leite e produtos derivados contaminados não pasteurizados oriundos de cabras, ovelhas, camelas e vacas infectadas. Ocasionalmente, o homem pode adquirir a infecção pelo contato direto com animais e seus produtos infectados ou pela manipulação laboratorial do agente biológico (Corbel, 1997; Godfroid et al., 2005). A *B. melitensis* entra no hospedeiro principalmente através do trato digestivo, mas também via trato respiratório, conjuntivas, mucosas ou pele lesionada (Godfroid et al., 2005). Contudo, os mecanismos de entrada, particularmente

através do trato digestivo são poucos conhecidos.

A patogenicidade da *Brucella* spp. está associada com sua capacidade de sobreviver e replicar dentro de células fagocíticas e não fagocíticas resultando na habilidade de causar infecção crônica no hospedeiro (Gorvel e Moreno, 2002). Estes aspectos da infecção por *Brucella* têm sido intensamente investigados em cultivos celulares e modelos animais. O camundongo é o modelo animal mais extensivamente usado pra estudar infecção crônica causada pelas espécies patogênicas de *Brucella* (Ficht, 2003). O sistema de secreção do tipo 4 (SST4) e o lipopolissacarídeo (LPS) estão entre os fatores de virulência da *Brucella* mais importantes já identificados. Eles são requeridos em diferentes estágios de sobrevivência extra e intracelular e na persistência da infecção em camundongos (Hong et al., 2000; Boschioli et al., 2002ab; Lapaque et al., 2005). Estudos recentes têm demonstrado um papel potencial da urease e hidrolase de sais biliares no estabelecimento da infecção gastrintestinal por *Brucella* spp. em camundongos (Bandara et al., 2007; Delpino, et al., 2007; Sangari et al., 2007). Contudo, o papel do SST4 e do LPS durante o estabelecimento da infecção gastrintestinal não é conhecido.

Melhor entendimento da patogênese da brucelose humana requer uma expansão do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na invasão e disseminação da bactéria bem como a resposta imunológica do hospedeiro à infecção. Embora o trato digestivo seja a rota mais importante de infecção por *Brucella* spp. no homem e também nos animais domésticos, a cinética da infecção e a resposta imunológica inata no trato digestivo não é bem caracterizada. Além disso, não existe informação disponível sobre o requerimento de fatores de virulência durante o estabelecimento da infecção sistêmica através do trato digestivo.

Com isso, o objetivo desta tese foi estabelecer um modelo de infecção gastrointestinal em camundongos, avaliar a cinética inicial da infecção e a resposta inflamatória desencadeada no local e investigar o requerimento da urease, SST4 e LPS da *B. melitensis* para o estabelecimento da infecção através do trato digestivo.

CAPÍTULO 1: BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Características gerais da infecção por *Brucella* spp.

Bactérias do gênero *Brucella* pertencem ao grupo α -proteobactéria e são coco-bacilos gram-negativos, intracelulares facultativos que causam infecção crônica no hospedeiro. As espécies do gênero *Brucella* infectam e causam doença em mamíferos e cada espécie é adaptada a um hospedeiro específico embora possa infectar outras espécies entre elas o homem (Godfrid et al., 2005). A infecção é caracterizada pelo comprometimento do sistema monocítico-fagocitário, infectando principalmente células fagocíticas como macrófagos e células dendríticas, além do comprometimento do sistema reprodutor feminino e/ou masculino (Verger et al., 1987; Nielsen e Duncan, 1990).

Usualmente, as espécies são nomeadas conforme seu hospedeiro preferencial. Atualmente são reconhecidas nove espécies de *Brucella* sendo seis capazes de infectar o homem em condições naturais: *Brucella melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. pinnipidialis* e *B. ceti*. A *Brucella melitensis* é considerada a espécie mais patogênica para o homem seguida pela *B. suis* e *B. abortus*. Já a *B. canis* raramente causa infecção no homem (Hartigan, 1997). Existem relatos de infecção natural e laboratorial com as espécies *B. pinnipidialis* e *B. ceti* isoladas de mamíferos marinhos (Brew et al., 1999; Sohn et al., 2003;

McDonald et al., 2006). Não há relatos de infecção humana pela *B. ovis*, *B. neotomae* ou pela mais recente espécie reconhecida do gênero: *B. microti* (Scholz et al., 2008). Curiosamente, uma nova espécie de brucella foi isolada em colônia de babuínos (*Papio* spp.) e foi associada a aborto e retenção de placenta em duas fêmeas (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009).

Infecção por *Brucella melitensis*

A *Brucella melitensis* foi a primeira espécie do gênero *Brucella* a ser descrita. O microorganismo foi primeiramente isolado no homem pelo Coronel Dr. David Bruce em 1887 na ilha de Malta e denominado como *Micrococcus melitensis* (Nicoletti, 2002). Existem evidências bem mais antigas da brucelose humana como lesões ósseas em esqueletos sugestivas de infecção por *Brucella*, porém a brucelose só foi reconhecida como zoonose no fim do século XIX. Soldados do exército desenvolveram a doença causada pelo *Micrococcus melitensis* conhecida como febre do mediterrâneo e a infecção foi associada à ingestão de leite *in natura* de cabras provenientes da ilha de Malta. O *Micrococcus melitensis* foi mais tarde renomeado para *Brucella melitensis* em homenagem ao Dr. Bruce (Nicoletti, 2002, Santos et al., 2005).

A *B. melitensis* é o principal agente etiológico da brucelose em pequenos ruminantes, embora grandes ruminantes também possam ser afetados. Infecção animal por *B. melitensis* tem distribuição ampla particularmente nas regiões do Oriente médio, Norte e Central da Ásia. A doença também ocorre no Sul da Europa, Norte da África e alguns países da América Latina (OIE, 2009). A *B. melitensis* tem três biovars distintos, 1, 2 e 3. O biovar 3 é descrito quase exclusivamente nos países do Mediterrâneo e Oriente Médio, enquanto o biovar 1 é encontrado predominantemente na América Latina. (Bricker e Halling, 1994). Importante salientar que *B. melitensis*

nunca foi isolada no Brasil sendo considerada exótica no país (Poester et al., 2002; OIE, 2009).

Em pequenos ruminantes, a infecção por *B. melitensis* causa doença apenas em animais sexualmente maduros. Animais jovens podem ser infectados, mas não mostram nenhum sinal clínico e a resposta sorológica é fraca e transitória. Por outro lado, a susceptibilidade aumenta após a maturidade sexual principalmente durante gestação (Alton, 1990). Em cabras e ovelhas, a infecção com *B. melitensis* causa abortamento, placentite e queda na produção de leite e os machos desenvolvem orquite e epididimite (OIE, 2004). Bovinos, camelos, suínos e ruminantes silvestres podem ser infectados quando em contato próximo com caprinos e ovinos infectados. Geralmente, a transmissão ocorre através de material excretado pelo trato genital de cabras e ovelhas infectadas. (Alton, 1990). Cães e outros canídeos silvestres podem servir de carreadores da infecção e até mesmo desenvolver a doença (OIE, 2004). As rotas de infecção são o trato digestivo, trato respiratório superior ou conjuntivas. Outras rotas potenciais são as mucosas do trato genital masculino e feminino (Alton, 1990; OIE, 2004).

O principal sinal clínico da infecção por *B. melitensis* em pequenos ruminantes é a falha reprodutiva com abortamento e nascimento de animais fracos. O abortamento ocorre durante os dois últimos meses de gestação (OIE, 2004). Geralmente cabras abortam na primeira gestação, não abortando na gestação seguinte, embora continue eliminando o agente. Aparentemente, a ocorrência de abortamento é menos frequente em ovelhas do que em cabras. Em machos, os órgãos reprodutivos são afetados e a bactéria pode ser eliminada pelo sêmen (Alton, 1990). O úbere é também um sítio de infecção por *B. melitensis*. Aproximadamente dois terços das infecções agudas adquiridas naturalmente durante a

gestação terminam em infecção da glândula mamária e na eliminação da bactéria no leite em lactações subsequentes. A persistência da infecção no úbere é acompanhada por descarga intermitente do agente no leite e redução na produção diária. Apesar disso, raramente sinais clínicos de mastite são detectados em cabras naturalmente infectadas (Alton, 1990).

A principal forma de transmissão da brucelose para o homem é o consumo de leite contaminado não pasteurizado e seus derivados como queijos preparados com leite *in natura* e a maioria dos casos clínicos de brucelose humana é causada por *B. melitensis* (Godfroid et al., 2005). A brucelose humana é também considerada uma doença ocupacional visto que profissionais que trabalham em contato direto com animais domésticos tem maior risco de adquirir a doença. Entre estes profissionais estão os médicos veterinários, criadores e magarefes que se infectam em contato com material infeccioso resultante de abortamento e secreções (Mahajan et al., 1986) ou carcaças (Barbuddhe et al., 2000). Além disso, pode ocorrer a infecção humana por acidentes com amostras vacinais. As vias conjuntival, respiratória ou penetração pela pele não integra são portas de entrada para infecção humana (Santos et al., 2005). Outra forma de contágio para é a manipulação laboratorial do agente com a transmissão ocorrendo principalmente através de aerossóis (Arlett et al., 1996). A brucelose é considerada a infecção bacteriana laboratorial mais comum e está incluída na lista de agente biológicos com potencial bioterrorista (Pappas et al., 2006a).

A brucelose humana é endêmica na região mediterrânea, no continente Asiático particularmente na Península Arábica e Mongólia, e no Norte da África (Hartigan, 1997; Pappas et al., 2006b). Na América Latina, a doença ocorre principalmente no México, Peru e Argentina (Pappas et al., 2006b). Países onde a doença foi controlada

ou erradicada dos animais domésticos houve uma diminuição acentuada dos casos de brucelose humana como no caso dos Estados Unidos e países da União Europeia (Godfroid e Käsbohrer, 2002). Contudo, ainda são reportados casos de brucelose humana nos Estados Unidos que estão diretamente associados a consumo de produtos de origem animal importados ou histórico de viagens internacionais para áreas onde a doença é endêmica (Pappas et al., 2006b).

A brucelose humana acomete principalmente jovens e adultos de meia idade e, geralmente, se apresenta como uma doença febril sem sinais clínicos específicos. A manifestação clínica depende dos órgãos afetados. Dentre os sinais clínicos mais frequentes estão calafrios, sudorese, febre intermitentes, artralgia, mialgia, cefaléia, mal-estar e anorexia (Santos et al., 2005; Mantur et al., 2007). Já as manifestações clínicas mais frequentes são alterações osteoarticulares (espondilites, osteomielites, poliartrites e tenossinovites), alterações genitourinárias (orquites, epididimites e pielonefrites), hepato e esplenomegalia podendo ocorrerem abscessos nestes órgãos (Colmenero et al., 1996; Hartigan, 1997). Além disso, ocorrem também alterações oculares, cutâneas, neurológicas, respiratórias, hematológicas, cardíacas e gastrointestinais. Entre as manifestações menos comuns, meningites, granulomas cerebrais e endocardites são as principais causas de morte por brucelose no homem. Abortamento não é considerado uma manifestação da infecção na mulher diferente do que ocorre nos animais domésticos (Hartigan, 1997; Mantur et al., 2007).

O diagnóstico presuntivo da infecção por *B. melitensis* nos pequenos ruminantes é baseado em testes sorológicos preconizados para diagnóstico de brucelose animal como teste de aglutinação lenta em tubo ou fixação de complemento. O diagnóstico definitivo é

baseado no isolamento e tipificação da bactéria de tecidos infectados que podem ser restos placentários, tecidos fetais, suab vaginal e leite (OIE, 2004). O diagnóstico da brucelose no homem também é baseado no isolamento e tipificação do organismo principalmente no sangue ou líquido sinovial (Yagupsky, 1999; Yagupsky et al., 2001). Entretanto, evidência sorológica associada a sinais compatíveis com a doença tem sido considerada como diagnóstico definitivo, uma vez que o isolamento do agente pode ser difícil e demorado (Mantur et al., 2007). Os métodos sorológicos como os teste de aglutinação lenta em tubo, imunofluorescência indireta e ELISA são os mais utilizados no diagnóstico da brucelose humana (Araj et al., 1990; Mantur et al., 2007). A detecção da *Brucella* pela PCR é outro a ser considerado. Além da rapidez da técnica, a PCR tem maior capacidade de detecção da bactéria do que o isolamento em várias formas de apresentação clínica. Adicionalmente, a técnica tem aplicação pós-terapêutica para detecção precoce de ressurgimento da infecção (Queipo-Ortuno et al., 1997; Morata et al., 2001).

Patogênese molecular da Brucelose

O genoma da *Brucella* possui similaridade maior que 90% entre as espécies com genoma completamente sequenciado (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. ovis*) (Verger et al., 1987; DelVecchio et al., 2002; Paulsen et al., 2002; Halling et al., 2005; Tsois et al., dados não publicados). Por esta razão, é preconizado que os mecanismos de invasão, multiplicação e sobrevivência intracelular são muito semelhantes entre as espécies de *Brucella*.

A *Brucella* é uma bactéria capaz de invadir células fagocíticas e não fagocíticas. Os mecanismos de adesão e entrada do patógeno em células não fagocíticas são pouco conhecidos. Adesinas, fatores de virulência de vários patógenos responsáveis pela adesão em células alvo, ainda não

foram identificados. Porém, existem evidências que este gênero possui moléculas específicas que participam na adesão as células. Recentemente foi identificada uma proteína de superfície, a SP41, que está associada à habilidade de adesão (Castañeda-Roldán et al., 2006). Por outro lado, nenhum receptor celular de superfície associado à invasão pela *Brucella* em células epiteliais foi identificado. A invasão da *Brucella* em células epiteliais se dá pelo rearranjo e recrutamento de filamentos de actina para o sítio de interação da bactéria com a membrana celular externa. Essa internalização envolve ativação de GTPases pequenas da subfamília Rho como Rho, Rac e cdc42. Estas GTPases são proteínas regulatórias do citoesqueleto de actina que participam na internalização de diversos patógenos intracelulares (Guzmán-Verri et al., 2001). Outras moléculas sinalizadoras citoplasmáticas como GMP cíclico, PIP3-kinase, MAP-kinase, estão envolvidas no processo de internalização da *Brucella*, uma vez que a inibição dessas prejudica a internalização (Guzmán-Verri et al., 2001; Gorvel e Moreno, 2002).

Em células fagocíticas profissionais, como os macrófagos, a penetração da *Brucella* ocorre distintamente das células epiteliais e de forma bem mais eficiente. A entrada de *Brucella* ocorre por fagocitose através de um recrutamento moderado de filamentos de actina. A ativação da fagocitose se dá pela ligação da *Brucella* a diversos receptores de superfície do macrófago como receptores da porção Fc de anticorpo (RFC), receptor de complemento (Rcb3), receptor de manose e fibronectina. A *Brucella* opsonizada é internalizada por células fagocíticas através de RFC e Rcb3 e as bactérias não opsonizadas entram nas células interagindo com fibronectinas (Campbell et al., 1994). Já foi demonstrado que essa entrada, assim como direcionamento para o tráfego intracelular é mediado por plataformas lipídicas (*lipid rafts*) (Lapaque et al., 2006). As plataformas lipídicas são aglomerados

lipídicos ricos em colesterol que têm distribuição aleatória na superfície celular e possuem a característica de se associar, expressar ou sinalizar várias proteínas específicas tanto na membrana externa quanto no citoplasma (Lafont e Van der Goot, 2005). Isto indica que receptores utilizados pela *Brucella* para entrar no macrófago e direcionar o tráfego intracelular para o sítio de replicação ficam localizados nestas plataformas lipídicas. Adicionalmente, sem estas plataformas lipídicas a *Brucella* até consegue entrar, mas é rapidamente destruída em fagolisossomos (Porte et al., 2003).

Os mecanismos de sobrevivência e replicação da *Brucella* em células fagocíticas, principalmente macrófagos, têm sido extensivamente estudados (Ficht, 2003). Apesar da *Brucella* não replicar dentro de neutrófilos, ela sobrevive e replica em células fagocíticas e não fagocíticas e seu tráfego dentro destes dois tipos celulares é muito semelhante (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Arenas et al., 2000; Gorvel e Moreno, 2002). Uma vez internalizada, o fagossomo contendo *Brucella* interage com endossomos iniciais e caso siga o trânsito normal, será associado a um endossomo tardio e posteriormente se fundirá com lisossomo formando fagolisossomo responsável pela degradação e morte intracelular do microorganismo. A maioria da *Brucella* internalizada em células fagocíticas é destruída por ação bactericida de radicais livres de oxigênio, óxido nítrico ou enzimas no interior de fagolisossomos. Contudo, um número restrito de bactérias resiste aos mecanismos bactericidas e evitam a fusão do fagossomo com lisossomos (Pizarro-Cerdá et al., 1998ab; Celli et al., 2003). A *Brucella* após inibir a fusão, redireciona seu vacúolo e interage com membrana do retículo endoplasmático onde sobrevive e se multiplica dentro das células hospedeiras. Esta sobrevivência intracelular inicial e inibição da fusão entre o fagossomo e lisossomo têm influência de alguns fatores

de virulência (Pizarro-Cerda et al., 1998ab; Arenas et al., 2000; Celli et al., 2003; Porte et al., 2003). Amostras de *Brucella* mutantes atenuadas não são capazes de direcionar o tráfego intracelular para o nicho de replicação e são eliminadas pelo fagolisossomos (Celli et al., 2003; Porte et al., 2003).

A *Brucella* não possui os fatores de virulência clássicos, presentes em outras bactérias, como exotoxinas, cápsula, flagelo ou LPS endotóxico (Moreno e Moriyon, 2002). Dentre os principais mecanismos de virulência da *Brucella* já identificados estão o sistema regulatório BvrR:BvrS, β -1,2 glucans cíclicos, LPS, TSS4, que são fatores importantes para a entrada, sobrevivência ou replicação intracelular (Boschiroli et al., 2002a; López-Gõni et al., 2002; Arellano-Reynoso et al., 2005; Lapaque et al., 2005).

O sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS da *Brucella* está envolvido com a expressão de proteínas de membrana externa (OMPs) que podem ser importantes no mecanismo de invasão. Os dois componentes do sistema são BvrR, uma proteína regulatória, e BvrS, uma proteína sensorial membro da super família das histidina-kinase. O sistema regulatório é necessário para recrutamento adequado das GTPases e filamento de actina e manutenção da integridade da membrana externa da bactéria (López-Gõni et al., 2002). Mutantes deficientes de BvrR/BvrS perdem a capacidade de invadir células não fagocíticas e também fagocíticas, por não conseguirem recrutar GTPases, particularmente Cdc42. Este sistema regulatório da *Brucella*, além de participar da invasão, é também importante para sobrevivência intracelular, pois mutantes são incapazes de prevenir a fusão fagossomo-lisossomo (Sola-Landa et al 1998; Guzmán-Verri et al., 2001; López-Gõni et al., 2002).

Um mecanismo adicional usado pela *Brucella* para evitar a fusão do vacúolo com

lisossomos são β -1,2 glucans cíclicos (Arellano-Reynoso et al., 2005). Estes glucans são componentes periplasmáticos sintetizados por bactérias do grupo α -proteobactéria como a *Brucella*. β -1,2 glucans cíclicos da *Brucella* interferem com a maturação do vacúolo contendo *Brucella* por atrapalhar ou bloquear as plataformas lipídicas assim alterando a expressão de proteínas na membrana vacuolar e impedindo a fusão com lisossomo. (Briones et al., 2001; Arellano-Reynoso et al., 2005).

O LPS é outro fator de virulência da *Brucella* que participa na sobrevivência inicial dentro dos macrófagos (Lapaque et al., 2005). O LPS é um componente importante para integridade funcional e estrutural da membrana externa de bactérias gram-negativas e possui três componentes: uma camada de oligossacarídeos, lipoproteína A e a cadeia O ou antígeno O. A caracterização do fenótipo liso ou rugoso do LPS do gênero *Brucella* depende da presença (LPS liso) ou ausência (LPS rugoso) da cadeia O (Cardoso et al., 2006). Sabe-se que a cadeia O é responsável por boa parte da virulência associada ao LPS liso. Amostras mutantes da cadeia-O do LPS são sempre atenuadas em macrófagos e camundongos (Lapaque et al., 2005). A *Brucella* consegue atrasar a maturação do fagossomo através da interação do LPS liso com plataformas lipídicas, contribuindo para a inibição da fusão fagossomo-lisossomal. Já as amostras mutantes rugosas atenuadas são incapazes de interagir com as plataformas lipídicas e são rapidamente direcionadas para a degradação no fagolisossomo (Porte et al., 2003). O LPS liso é resistente a ação do complemento e de peptídeos catiônicos antimicrobianos como as α -defensinas presentes em neutrófilos e células de Paneth no trato gastrintestinal (Martinez de Tejada et al., 1995; Tumuskhuu et al., 2006). Além disso, o LPS liso da *Brucella* possui baixa imunogenicidade e é resistente ao óxido nítrico, radicais livres, e lisozimas que são mecanismos bactericidas dos macrófagos e

neutrófilos (Moreno et al., 1981; Rasool et al., 1992; Allen et al., 1998; Fernandes-Prada et al., 2003; Jimenez de Bagues et al., 2004; Lapaque et al., 2005). Desta forma, o LPS liso da *Brucella* é importante para resistir a mecanismos antimicrobianos extra e intracelulares do hospedeiro.

Tem sido bem demonstrado que o SST4 da *Brucella*, codificado pelo operon *virB*, composto por 12 genes (*virB1* a *virB12*), é requerido para crescimento intracelular de *Brucella* em células fagocíticas e não fagocíticas (Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001; Boschioli et al., 2002ab; Den Hartigh et al., 2004 e 2008). Um SST4 hortólogo foi inicialmente identificado em um patógeno de planta, *Agrobacterium tumefaciens*, tendo sido posteriormente reconhecido como um fator de virulência de outros patógenos como *Legionella pneumophila* e *Bordetella pertussis*. Em geral, o TSS4 é um fator de virulência caracterizado por um aparato transportador localizado na membrana externa capaz de transportar DNA bacteriano ou moléculas para dentro da célula alvo (O'Callaghan et al., 1999). O SST4 da *Brucella* aparentemente não secreta DNA e somente recentemente algumas moléculas secretadas por este sistema foram identificadas (de Jong et al., 2008). Possivelmente, as moléculas efectoras secretadas participam da maturação do vacúolo contendo *Brucella* e seu transporte para o sítio de replicação associada ao retículo endoplasmático (Boschioli et al., 2002a). A expressão do SST4 que é induzida no ambiente intracelular durante a infecção de macrófagos é favorecida com a acidificação intracelular de macrófagos e parece ser regulada por um sistema regulatório *sensum quorum* conhecido como VjbR (Porte et al., 1999; Köhler et al., 2002; Boschioli et al., 2002b; Rambow-Larsen et al., 2008). Embora o sistema de secreção seja absolutamente necessário para a replicação e sobrevivência intracelular da bactéria, aparentemente, o SST4 não

participa do processo de invasão ou fase inicial da sobrevivência intracelular. O papel crítico do SST4 na sobrevivência da bactéria dentro da célula do hospedeiro reflete em uma persistência menor em camundongos infectados com amostras de *Brucella* deficientes do SST4 (O'Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000; Sun et al., 2002; Den Hartigh et al., 2004; Celli, 2006).

Uma vez que a bactéria atravessa a mucosa de seu sítio de entrada, ela é fagocitada pelos macrófagos residentes e se dissemina para linfonodos regionais (Anderson et al., 1986a; Ackermann et al., 1988). A *Brucella* consegue se disseminar sistemicamente independente do sítio de entrada através principalmente da migração, pela corrente sanguínea e vasos linfáticos, de células fagocíticas infectadas como os macrófagos. Cabe salientar que a entrada no trato gastrointestinal tem sido associado ao transporte pelas células M, via pela qual a *Brucella* facilmente atinge macrófagos e células dendríticas da lâmina própria (Ackermann et al., 1988; Pappas e Papadimitriou, 2007; Salcedo et al., 2008). Devido à habilidade da bactéria de sobreviver e replicar dentro de células fagocíticas, a *Brucella* persiste no tecido linfóide do hospedeiro causando uma infecção crônica sem sinais clínicos aparentes. Uma vez que atinge seu sítio de replicação, a bactéria pode sobreviver por longo período dentro da célula (Gorvel e Moreno, 2002). O organismo se mantém principalmente nos órgãos linfóides como linfonodos e baço e em macrófagos no fígado e na glândula mamária (Nielsen e Dulcan, 1990). A forma como a *Brucella* é liberada do nicho intracelular para infectar outras células não é conhecido detalhadamente, mas sua multiplicação descontrolada dentro da célula como em células trofoblásticas leva a morte celular e liberação do agente (Anderson et al., 1986b).

Estudos recentes têm demonstrado que a *Brucella* não causa estímulo inflamatório ou

somente um estímulo muito discreto nos sítios de entrada e, desta forma, evita ou atrasa a resposta imunológica efetora permitindo assim sua invasão e sobrevivência intracelular e consequente disseminação no hospedeiro (Barquero-Calvo et al., 2007; Carvalho Neta et al., 2008; Cirl et al., 2008; Salcedo et al., 2008). Sabe-se que o LPS da *Brucella* estimula fracamente a resposta inflamatória, atrapalha a apresentação de antígeno via MHC II, além de ser capaz de inibir a maturação de células dendríticas e consequentemente, prejudicar o desenvolvimento da resposta imunológica adquirida mediada por célula, efetiva para o controle da infecção (Forestier et al., 2000; Jimenez de Bagues et al., 2004; Lapaque et al., 2006; Billard et al., 2007; Barrionuevo et al., 2008; Barquero-Calvo et al., 2007; Salcedo et al., 2008). Interessantemente, amostras virulentas de *Brucella* com LPS liso são capazes de inibir apoptose de macrófagos infectados (Gross et al., 2000; Eskra et al., 2003; Fernandez-Prada et al., 2003; Pei e Fichth, 2004). Por outro lado, amostra mutante com LPS rugoso induz a morte celular dos macrófagos (Pei e Fichth 2004; Pei et al., 2006).

Em contrapartida, estudos recentes têm demonstrado que o TSS4 funcional é necessário para induzir uma resposta inflamatória e imunológica durante a infecção por *Brucella* em camundongos diferentemente da amostra mutante com SST4 não funcional (Roux et al., 2008). Além disso, a ativação de linfócitos B maduros e de linfócitos T CD4+ durante a infecção é parcialmente dependente de SST4 (Rolán e Tsolis, 2007). Em adição, o SST4 mostra-se importante para induzir a secreção inicial de citocinas como IL-12 (Interleucina 12) e IFN γ (Interferon gama) durante a infecção indicando sua importância para o desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo Th1 pelo hospedeiro (Rolán e Tsolis, 2008). Também foi demonstrado que o SST4 é necessário para a indução da formação de microgranulomas,

que é a alteração histopatológica mais comum em camundongos infectados com *Brucella* (Rolán et al., 2009 no prelo).

Resposta imunológica inata à brucelose

Macrófagos, células dendríticas e trofoblastos são as células alvo durante infecção por *Brucella* (Celli et al., 2003; Salcedo et al., 2008; Carvalho Neta et al., 2008). A interação entre *Brucella* e macrófagos ou células dendríticas durante os estágios iniciais de infecção pode ter uma influência crucial na natureza da resposta imunológica desencadeada que é altamente dependente do perfil de citocinas induzidas durante a infecção (Zhan et al., 1996; Murphy et al., 2001). Esta interação inicial é mediada pelos receptores (PRRs do inglês *pattern recognition receptors*) que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs do inglês *pathogen associated molecular patterns*). O grupo de PRRs melhor caracterizados até o momento são os receptores semelhantes a Toll (TLR do inglês *Toll like receptor*). Os TLRs são expressos em diversos tipos celulares como macrófagos e células epiteliais (Uematsu e Akira, 2006). *Brucella* é reconhecida por TLR-2, TLR-4 e TLR-9 (Barquero-Calvo et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Salcedo et al., 2008; Macedo et al., 2008). O LPS e lipoproteínas são reconhecidos por TLR-4 e TLR-2 respectivamente. Já TLR-9 tem sua expressão restrita ao compartimento endossomal do citoplasma e é um receptor para DNA bacteriano intracelular reconhecendo CpG-DNA (Uematsu e Akira, 2006). Este reconhecimento estimula vias intracelulares de sinalização que culmina em rápida indução de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras (Oliveira et al., 2008).

A primeira evidência que PAMPs da *Brucella* interagem com TLRs foi demonstrado utilizando *B. abortus* morta pelo calor (HKBA) a qual estimula as células via MyD88 resultando em

translocação NF- κ B e secreção de citocinas como TNF α (Fator de necrose tumoral alfa), IL-6 e IL-12 (Huang et al., 2003). A membrana externa de *Brucella* são componentes ativos em HKBA estimulando uma resposta TLR-2 (Huang et al., 2003; Giambartolomei et al., 2004). Em macrófagos, a indução de TNF α é via TLR-4 e TLR-2 e depende da bactéria viva (Barquero-Calvo et al., 2007). A indução de TNF α é dependente de TLR-2 e independente de TLR-4 em células dendríticas. Já a secreção de IL-12 não é dependente nem de TLR-2 nem de TLR-4 em macrófagos enquanto é TLR2 dependente em células dendríticas (Macedo et al., 2008). Diferentemente, TLR-9, qual reconhece DNA de *Brucella* em endossomos, não é requerido em macrófagos ou células dendríticas para indução de TNF α e não induz secreção de IL-12 (Huang et al., 2005; Macedo et al., 2008). Contudo outras citocinas do tipo IFN γ são induzidas por HKBA via TLR-9 (Huang et al., 2005).

O LPS da *Brucella* não é um forte agonista de TLR-4. Sua estrutura peculiar apresenta uma baixa atividade imunoestimulatória e baixa endotoxicidade (Lapaque et al., 2005). Como resultado, o LPS da *Brucella* é centenas de vezes menos ativo e tóxico do que LPS da *E. coli* e tem uma habilidade reduzida para ativar citocinas proinflamatórias comparada a LPS de *Salmonella* (Jimenez de Bagues et al., 2004; Dueñas et al., 2004; Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007). *Brucella* sinaliza através de TLR-4 e TLR-2, ativando macrófagos somente após 42 horas de infecção em contraste com *Salmonella* que ativa macrófagos via TLR-4 logo após 6 horas de infecção (Weiss et al., 2005). Quando *Brucella* com LPS fenotipicamente diferentes são comparadas, a *B. abortus* mutante com LPS rugoso consegue estimular mais TLR-4 e consequentemente ativar macrófago do que amostra virulenta com LPS liso. Além disso, tem sido

demonstrado que a interação do LPS da *B. abortus* e TLR-4 tem papel importante na internalização bacteriana pelo macrófago (Pei et al., 2008). Existem evidências de que outras moléculas da *Brucella*, além do LPS possam estimular células dendríticas via TLR-4. A enzima lumizine sintase, a BLS, interage com TLR-4 e estimula a expressão de moléculas co-estimuladoras e produção de IL-6, TNF α e IL-12 (Berguer et al., 2006).

Embora lipoproteínas da *Brucella* sejam responsáveis pela resposta proinflamatória induzida via TLR-2, este receptor não é importante para o controle da infecção por *Brucella* em camundongos (Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007). Por outro lado, o papel do TLR-4 durante a eliminação da infecção em camundongo é controversa. Alguns estudos indicam que TLR-4 tem papel no controle da infecção por *Brucella* em camundongo (Campos et al., 2004; Copin et al., 2007), e outros estudos não demonstram nenhum envolvimento de TLR-4 na resistência (Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007). Finalmente, tem sido demonstrado que TLR-9 é requerido para controle da infecção por *Brucella in vivo* (Copin et al., 2007; Macedo et al., 2008). Já o papel do MyD88 no controle da infecção por *Brucella in vivo* tem sido claramente demonstrado independentemente do TLR envolvido. O MyD88 afeta tanto a maturação de células dendríticas quanto a função dos macrófagos (Weiss et al., 2005; Copin et al., 2007; Macedo et al., 2008) e é crítico para ativação de NF- κ B e consequentemente indução de citocinas proinflamatórias como TNF α durante infecção por *Brucella* (Huang et al., 2003; Huang et al., 2005; Macedo et al., 2008). Adicionalmente, a maturação de células dendríticas e a produção de IL-12 é dependente de MyD88 regulando a ativação de célula T produzindo IFN γ (Macedo et al., 2008).

Embora tenha sido mostrado que *Brucella* viva ou morta induz citocinas proinflamatórias (Campos et al., 2004; Weiss et al., 2005), as concentrações *in vivo* de IL-10, IL1 β , IL-6 e TNF α foram comparativamente insignificantes após infecção com *B. abortus* em camundongos, quando comparada a infecção com *Samonella enterica* (Barquero-Calvo et al., 2007). Adicionalmente, foi demonstrado uma supressão de citocinas e mediadores proinflamatórias durante a fase inicial da infecção em células trofoblásticas bovinas durante infecção com *B. abortus* (Carvalho Neta et al., 2008). Interessantemente, estudos recentes demonstraram que *Brucella* interfere com a sinalização do TLR através da produção de uma proteína que contém um domínio semelhante a TIR interferindo com a sinalização via TLR/MyD88 (Cirl et al., 2008; Salcedo et al., 2008). Dois grupos independentemente identificaram recentemente proteínas de *Brucella* nomeadas Btp1 em *B. abortus* (Salcedo et al., 2008) e TcpB em *B. melitensis* (Cirl et al., 2008). A Btp1 afeta a sinalização via TLR-2 inibindo a maturação de células dendríticas afetando a função das células dendríticas e a secreção de citocinas proinflamatórias (Salcedo et al., 2008). Semelhantemente, a TcpB interage com MyD88 prejudicando a sinalização via TLR-2 e TLR-4, prevenindo a secreção de citocinas (Cirl et al., 2008). Estas proteínas parecem constituir um novo fator de virulência que tem a habilidade de inibir a sinalização TLR/MyD88 específica e com isso suprimir a imunidade inata do hospedeiro durante a infecção. Em resumo, a *Brucella* pode interagir com TLR-2, TLR-4 e TLR-9 e possivelmente, é capaz de prejudicar ou inibir a ativação dos mecanismos inflamatórios do hospedeiro favorecendo a sua sobrevivência intracelular.

Existem vários efetores da imunidade inata que participam durante a infecção por *Brucella*, incluindo complemento, citocinas,

neutrófilos, macrófagos e células natural killer (NK). Por outro lado, a *Brucella* tem fatores de virulência que permitem que ela escape ou resista à ação desses mecanismos efetores. As OMPs e o LPS de bactérias gram-negativas estão usualmente envolvidos na sensibilidade ao soro e ativação do complemento pela via clássica ou alternativa (Lapaque et al., 2005). Aparentemente, a *Brucella* tem a habilidade de inibir a ativação da via alternativa do complemento via LPS (Lapaque et al., 2005; Cardoso et al., 2006; Barquero-Calvo et al., 2007). Amostras de *B. abortus* sensíveis ao soro induz a via clássica de cascata de complemento em bovinos (Corbeil et al., 1988; Eisenschenk et al., 1995; Eisenschenk et al., 1999). Por outro lado, amostras de *B. abortus* resistentes ao soro não ativa a cascata de complemento. A *Brucella* que sobrevive a morte direta é opsonizada por C3 e fagocitada (Eisenschenk et al., 1999). Sabe-se que a cadeia O do LPS de *B. abortus* bloqueia o acesso de C1q a proteínas de membrana externa e o seu comprimento impede a adesão de C3b (Rasool et al., 1992; Eisenschenk et al., 1999). Desta forma, amostras rugosas de *Brucella* são consideradas mais susceptíveis a morte por ação do complemento do que as amostras lisas (Corbeil et al., 1988; Eisenschenk et al., 1995; Lapaque et al., 2005).

O Lipídeo A e LPS de bactérias gram-negativas induzem a produção de radicais livres em células fagocíticas que são responsáveis pela atividade bactericida (Rasool et al., 1992). Cabe ressaltar que, a *Brucella* tem mecanismos para prevenir recrutamento significativo de neutrófilos e de resistir aos seus produtos bactericidas (Rasool et al., 1992; Barquero-Calvo et al., 2007). Amostras lisas de *Brucella* induzem a degradação mínima de neutrófilos e são mais resistentes a morte intracelular do que amostras rugosas (Riley e Robertson, 1984a; Riley e Robertson, 1984b; Barquero-Calvo et al., 2007). Estudos recentes enfatizam que

infecção por *B. abortus* induz explosão respiratória e degranulação expressivamente menor dos neutrófilos comparada a outras bactérias intracelulares patogênicas como *Salmonella*. Estes resultados sugerem que os neutrófilos não têm papel importante no controle da infecção por *B. abortus* e como uma possível consequência, eles servem como carreadores da bactéria no hospedeiro (Barquero-Calvo et al., 2007).

A *Brucella* tem vários mecanismos para evadir as defesas dos macrófagos e estabelecer infecção (Celli et al., 2003; Porte et al., 2003; Arellano-Reynoso et al., 2005; Loisel-Meyer et al., 2006). Embora a redução do pH intrafagossomal seja um mecanismo importante de destruição dos macrófagos, *Brucella* consegue sobreviver em compartimentos intracelular acidificado a pH abaixo de 4. A *Brucella* não só sobrevive a acidificação, mas a acidificação inicial dentro do fagossomo é essencial para replicação intracelular pois a neutralização do pH fagossomal prejudica a replicação intracelular de *B. suis* (Porte et al., 1999; Köhler et al., 2002). Além disso, a infecção por *Brucella* estimula fracamente a produção de Óxido Nítrico Sintase indutível (iNOS) em comparação com LPS de *Escherichia coli* (Gross et al., 1998; Wang et al., 2001). O NO contribui para matar a *Brucella* com localização intracelular apenas nas primeiras 24 horas de infecção afetando particularmente bactéria opsonizadas (Gross et al., 1998; Wang et al., 2001; Gross et al., 2004). Além disso, a deleção do gene de *Brucella* que codifica NO redutase gera amostra de *B. suis* atenuada em camundongo (Loisel-Meyer et al., 2006). Estes resultados sugerem que A *Brucella* pode limitar a produção de NO pelos macrófagos para garantir sua sobrevivência intracelular. Por outro lado, a explosão oxidativa, ativada pela NADPH oxidase após a fagocitose, é importante para eliminação de *B. abortus* em macrófagos ativados por IFN γ (Jiang et al., 1993; Sun et al., 2002). Macrófagos ativados por IFN γ suplementados com ferro matam

mais eficientemente A *Brucella* intracelular devido a habilidade do ferro catalisar radicais de oxigênio (ROI) (Baldwin et al., 1993). Contudo, os ROI não são críticos para limitar o crescimento bacteriano em camundongo (Sun et al., 2002).

As células NK são capazes de matar células infectadas e podem diretamente causar lise de bactérias gram-negativas (Garcia-Penarrubia et al., 1989). Suas propriedades antimicrobianas podem potencialmente contribuir para o controle da infecção por *Brucella*, como ocorre com outras infecções com bactérias intracelulares. Em estudo *in vitro* usando *B. suis* mais co-cultura com macrófagos humanos e células NK sugere que elas têm importância no controle da infecção por *Brucella* (Dornand et al., 2004). As células NK humanas são capazes de matar macrófagos infectados e inibir a proliferação do patógeno. O efeito citotóxico é principalmente mediado pelo contato célula-célula resultando na liberação de granzimas e perforinas nos macrófagos infectados bem como produção de citocinas como IFN γ (Dornand et al., 2004). Contrariamente, estudos têm demonstrado que as células NK não exercem um papel importante no controle da infecção por *B. abortus* em pacientes com brucelose aguda ou em camundongos (Salmeron et al., 1992; Fernandes et al., 1995). Embora as células NK sejam estimuladas em camundongos infectados por *Brucella*, elas não são suficientes para eliminar toda bactéria do animal infectado. (Fernandes et al., 1995).

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são células associadas primariamente com imunidade adaptativa, mas eles atuam também na imunidade inata com uma contribuição significativa na produção de IFN γ (Boismenu e Havran, 1997). O papel particular de linfócitos T $\gamma\delta$ durante infecção pela *Brucella* tem sido demonstrado na brucelose humana uma vez que o número de linfócitos T $\gamma\delta$ aumenta significativamente no sangue periférico

durante fase aguda de infecção por *B. melitensis* (Bertotto et al., 1993). A *B. suis* estimula a proliferação dos linfócitos T $\gamma\delta$ e estas células são ativadas por macrófagos infectados (Ottone et al., 2000a; Dornand et al., 2002). Os linfócitos T $\gamma\delta$ podem contribuir para o controle da infecção por *Brucella* no homem devido à combinação de mecanismos incluindo lise de macrófagos infectados via efeitos citotóxicos e redução da carga bacteriana pela secreção de peptídeos e citocinas antimicrobianas (Ottone et al., 2000b; Oliaro et al., 2005; Dudal et al., 2006).

A resistência à patógenos intracelulares como *Brucella* é altamente dependente da habilidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune celular (Th1), que é mediada por citocinas como IFN γ , IL-12, IL-2, TNF α . Estas citocinas ativam macrófagos, linfócitos e outros efetores da imunidade inata ou adaptativa para otimizar sua capacidade de eliminar o patógeno (Janeway et al., 2001). Análises de microarranjos demonstram que *B. abortus* induz a expressão de citocinas proinflamatórias como TNF α , IL-1 β e moléculas modulatórias associadas com resposta Th1, como IL-12 e MHC II em macrófagos durante estágios iniciais de infecção (Eskra et al., 2003).

Infecção por *Brucella in vivo* resulta em aumento da expressão gênica induzida por interferon do tipo I e II em esplenócitos de camundongos infectados (Roux et al., 2007). Além disso, a infecção por *Brucella* pode também induzir a expressão IFN α e IFN β (Huang et al., 2005; Salcedo et al., 2008). Embora a resposta IFN do tipo I seja reconhecida como essencial contra infecções virais, a mesma pode também ser induzida em resposta às infecções bacterianas (Decker et al., 2005). Contudo, o papel protetor da resposta de IFN do tipo I durante a infecção por amostra virulentas de *Brucella* não está claro (Roux et al., 2007).

No modelo murino de infecção, a IL-12 endógena estimula a produção IFN γ e a eliminação da bactéria *in vivo* (Zhan e Cheers, 1995; Zhan et al., 1996). A depleção de IL-12 resulta em produção reduzida de IFN γ por esplenócitos, redução da esplenomegalia com diminuição do número e ausência da ativação dos macrófagos (Zhan e Cheers, 1995). Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* demonstraram a indução da secreção de TNF α e IL-12 p40 requer a via MyD88 intacta durante infecção por *Brucella* (Huang, et al., 2005; Macedo et al., 2008).

O papel importante do IFN γ no controle da infecção por *Brucella* em camundongos tem sido bem estabelecido através de estudos *in vitro* e *in vivo* (Jones e Winter, 1992; Jiang e Baldwin, 1993; Zhan e Cheers, 1993; Dornand, 2002). Estudos *in vitro* demonstram que macrófagos tratados com IFN γ tem maior habilidade para inibir o crescimento de *B. abortus* quando comparada a macrófagos não tratados (Jones e Winter, 1992; Jiang e Baldwin, 1993). Adicionalmente, a depleção do IFN γ endógeno em camundongos resulta em um aumento no número de *B. abortus* no baço e no fígado, acompanhado por menor esplenomegalia e menor número de macrófagos no baço de animais infectados. Além de disso, quando a habilidade de produzir IFN γ é restaurada, a eliminação da *Brucella* ocorre rapidamente (Zhan e Cheers, 1993). Em humanos, demonstrou-se que as concentrações de IFN γ no soro de pacientes com brucelose decresce ao longo do curso de infecção (Rafiei et al., 2006), mas a importância desta citocina na infecção humana ainda não foi claramente definida.

Alternativamente, o TNF α é importante no controle da infecção por *Brucella* em camundongos, principalmente durante as fases iniciais da infecção (Zhan et al., 1996). Contudo, a depleção de TNF α antes da infecção por *Brucella* não prejudica a produção de IFN γ pelos linfócitos T em

resposta a antígenos da *Brucella*. Conseqüentemente, o TNF α está envolvido com resistência a brucelose via ação direta de células efectoras e não é essencial para a indução resposta adquirida em camundongos (Zhan et al., 1996). Por outro lado, macrófagos humanos não são capazes de produzir TNF α quando inoculados com *B. suis* viva embora *Brucella* morta pelo calor estimule a produção desta citocina (Dornand et al., 2002). A falha na produção de TNF α por células infectadas por *Brucella* no homem é provavelmente devido mecanismo de ação bacteriano agindo diretamente na transcrição celular capaz de prejudicar as vias de sinalização que levam a secreção de TNF α (Caron et al., 1994). Conseqüentemente, durante o processo de fagocitose de *Brucella* por macrófagos humanos a ausência de TNF α pode resultar em inibição dos mecanismos bactericidas bem como na falha de ativação de células NK. O comprometimento desses mecanismos pode favorecer o estabelecimento de bactéria nas células humanas (Dornand et al., 2002).

Outras citocinas podem ser produzidas durante a infecção por *Brucella* e o papel delas durante a infecção tem sido investigado. A IL-10 é induzida no camundongo em resposta à imunização com a amostra B19 de *B. abortus* inativada pelo calor (Svetic et al., 1993). A IL-10 endógena tem efeito prejudicial no controle da infecção por *B. abortus* em camundongos BALB/c mesmo na presença de IFN γ (Fernandes e Baldwin, 1995). Estudos *in vitro* também demonstraram que a IL-10 pode inibir as funções bactericidas de macrófagos contra *Brucella*, bem como diminuir a produção de IFN γ por esplenócitos em resposta a estimulação por antígenos de *Brucella* (Fernandes e Baldwin, 1995). Já camundongos experimentalmente infectados com *B. abortus* têm diminuição na síntese de IL-18 (Fernández-Lago et al., 2005). A IL-18 tem um efeito proinflamatório direto em células NK e

linfócitos T, favorecendo proliferação e citotoxicidade e estimulando a produção de citocinas como TNF α (Dinarelo e Fantuzzi, 2003). Além disso, um estudo demonstrou que a lipoproteína OMP-19 de *B. abortus* estimula macrófagos a produzir IL-6 via TLR-2 (Giambartolomei et al., 2004). A secreção de IL-6 inibe a expressão de MHC II induzida por IFN γ e a apresentação de antígeno por macrófagos infectados por *Brucella* (Barrionuevo et al., 2008). Esta nova evidência sugere que IL-6 tem um efeito inibitório na função de macrófagos durante infecção *in vitro*. O papel de IL-6 *in vivo* ainda não foi determinado.

Camundongo como modelo animal de infecção por *Brucella*

Modelos animais experimentais para brucelose são amplamente utilizados com intuito de estudar patogênese e resposta imunológica a doença e desenvolver métodos de tratamento, controle e vacinas tanto para o homem quanto para animais domésticos. O camundongo (*Mus musculus*) é sem dúvida o modelo animal experimental mais utilizado na infecção por *Brucella* seguido por estudos em ratos (*Ratus norvegicus*), porquinhos da índia (*Cavia porcellus*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), ramsters (*Mesocricetus auratus*) e gerbils (*Meriones unguiculatus*) (Garcia-Carrillo, 1990).

Camundongos são considerados mais resistentes à infecção por *Brucella* do que o porquinho da índia, porém mais susceptível que ratos, sendo necessário de 10^4 a 10^6 UFC (unidades formadoras de colônia) para infecção. A *Brucella* entra na corrente sanguínea causando bacteremia independente da rota de infecção. O camundongo desenvolve infecção crônica, mas não somente quando desafiado com amostras virulentas, mas também com amostras vacinais atenuadas (Garcia-Carrillo, 1990). A infecção no camundongo aparentemente tem três fases: fase de

multiplicação durante os sete primeiros dias, um período de alta atividade bactericida entre 15 a 20 dias e fase latente caracterizado pelo declínio lento da contagem de UFC. Durante cinco a seis semanas, o número de UFC é estável e a *Brucella* pode ser isolada até três meses após infecção. A principal ou a única alteração macroscópica observada é esplenomegalia (Birmingham e Jeska, 1981).

Existem várias linhagens de camundongos com suscetibilidades distintas à infecção por *Brucella* (Ho e Cheers, 1982; Fernandes et al., 1996; Sathiyaseelan et al., 2000). As linhagens de camundongos mais utilizadas como modelo de infecção são BALB/c, C57BL/6, C57BL/10 e CBA (Baldwin e Parent, 2002). C57BL é considerada uma linhagem mais resistente à infecção por *Brucella* que BALB/c devido a resposta imunológica diferenciada (Baldwin e Parent, 2002; Murphy et al., 2001; Fernandes et al., 1996). Camundongos *knockouts* com deficiência na produção de citocinas, células ou moléculas relacionadas à resposta imunológica inata ou adquirida têm sido utilizados para comprovar se estes componentes são determinantes ou não para controle da infecção (Fernandes-Lago et al., 1996; Murphy et al., 2001; Rolán e Tsois, 2007; Oliveira et al., 2008). Além disso, o camundongo é considerado um bom modelo animal para identificar fatores de virulência importantes para o estabelecimento ou persistência da infecção, além de ser o primeiro modelo animal usado para testar amostras candidatas à vacina (Hong et al., 2000; Ko e Splitter, 2003; Lapaque et al., 2005).

A via intraperitoneal é a via mais comumente usada no modelo murino com objetivo de favorecer a disseminação sistêmica imediata da *Brucella* e sua proliferação em tecidos linfóides, principalmente no baço (Stevens et al., 1994; Baldwin e Parent, 2002). Estudos recentes têm verificado o papel de alguns fatores de virulência durante a

infecção oral (Bandara et al., 2007; Delpino, et al., 2007; Sangari et al., 2007). Tendo em vista que a via oral é a principal rota de infecção no homem e nos animais domésticos, um modelo murino de infecção oral ou gastrointestinal permite o estudo da patogênese mais adequada, desta forma mais estudos devem explorar esta rota de infecção. Visto que o aerossol é uma fonte importante de infecção por *Brucella* e é principal forma de disseminação de uma arma biológica, o modelo animal de infecção por via aerógena tem sido estabelecido (Mense et al., 2001; Olsen et al., 2007; Kahl-McDonagh et al., 2007). A dose inoculante é 10^6 a 10^7 UFC, embora doses baixas como 10^2 e 10^3 UFC por animal podem estabelecer a infecção aerógena no camundongo (Olsen et al., 2007; Kahl-McDonagh et al., 2007).

O modelo de infecção em camundongos avalia principalmente a persistência da bactéria em órgãos como baço e fígado em relação ao tempo de infecção (Enright et al., 1990; Stevens et al., 1994; Fernandes et al., 1996). Embora no modelo murino a principal avaliação feita é a colonização bacteriana dos órgãos, avaliação histopatológica, assim como avaliação da expressão gênica têm sido exploradas. O baço é o principal órgão afetado apresentando elevada colonização bacteriana, esplenomegalia e infiltração neutrofílica agudamente e histiocitária cronicamente (Enright et al., 1990; Tobias et al., 1993; Stevens et al., 1994). O fígado também apresenta contagem bacteriana elevada, embora menor que o baço (Enright et al., 1990; Kahl-McDonagh et al., 2007; Izadjoo et al., 2008). Inflamação caracterizada por infiltrado neutrofílico e histocitário com microgranulomas multifocais é a lesão inflamatória causada por *Brucella* no fígado (Enright et al., 1990; Tobias et al., 1993). O acometimento do pulmão ocorre em camundongos inoculados por via aerógena com amostra patogênica. Existe uma colonização bacteriana

significativa dos pulmões sem que ocorra nenhuma lesão histológica significativa (Mense et al., 2001; Kahl-McDonagh et al., 2007). O acometimento do trato gastrointestinal durante infecção oral ou gastrointestinal em camundongos ainda não foi investigado.

O uso do camundongo como modelo de brucelose nos animais domésticos é controverso. Em camundongos gestantes infectados com *B. abortus*, por diversas vias, não é observado abortamento ou morte fetal embora ocorra placentite e colonização da placenta (Bosserey, 1982; Tobias et al., 1993). Além disso, durante a infecção do útero gestante, em torno de 60 % dos fetos são infectados (Bosserey, 1982). Por outro lado, um modelo de morte fetal em camundongos da linhagem ICR infectados com *Brucella* foi descrito (Kim et al., 2005). Embora o abortamento tenha ocorrido apenas quando camundongos foram infectados com 4,4 dias de gestação, a colonização das células trofoblásticas na placenta ocorreu em todos os períodos avaliados (Kim et al., 2005). Fêmeas BALB/c gestantes infectadas com *B. abortus* apresentam placentite caracterizada por necrose multifocal intensa a coalescente, infiltrado neutrofílico intenso e colônias bacterianas intracelulares em células trofoblásticas (Tobias et al., 1993). A severidade da lesão e a colonização bacteriana aumentam com o curso da gestação (Tobias et al., 1993; Kim et al., 2005) e as lesões histológicas são semelhantes às lesões encontradas na placenta de bovinos infectados (Xavier et al., 2008).

Recentemente, camundongos machos foram usados para verificar a patogenicidade da *Brucella* ao trato genital masculino (Izadjoo et al., 2008). Visto que tanto nos animais domésticos como no homem a *Brucella* pode causar lesão neste sistema (Silva et al., 2005; Santos et al., 2005). Há evidências de que órgãos reprodutivos masculinos de camundongos também apresentam alterações histopatológicas durante a infecção por *Brucella* sp. Camundongos BALB/c com maturidade sexual, inoculados com cepa virulenta de *B. melitensis* apresentaram infiltrado histiocitário perivascular moderado nos testículos associado a histiocitose intensa e com perda da arquitetura normal nos linfonodos inguinais. A colonização bacteriana no trato reprodutivo masculino foi detectada em 22,8% dos animais, porém, de forma intermitente (Izadjoo et al., 2008).

A *Brucella* apresenta patogênese peculiar, pois causa lesões inflamatórias em órgãos do sistema reprodutor e pode ser isolada de diversos órgãos do sistema monocítico-fagocitário sem causar lesão. Enfim, o uso de animais de laboratório como modelo animal para brucelose não mimetiza fielmente a manifestação da doença nos animais domésticos ou no homem, pois a ocorrência de abortamento e lesões osteoarticulares não são as alterações comumente observadas em camundongos infectados. Contudo, a colonização e persistência da bactéria em órgãos linfóides destes animais permitem o estudo da infecção.

CAPÍTULO 2: CINÉTICA DE INFEÇÃO POR *B. MELITENSIS* PELO TRATO DIGESTIVO

Objetivos

Estabelecer um modelo de infecção gastrointestinal por *B. melitensis* em camundongos verificando a cinética inicial da infecção e a resposta inflamatória desencadeada.

Material e métodos

Condições de cultivo e preparação do inóculo:

Brucella melitensis amostra virulenta de referência 16M foi cultivada em placas Tryptic Soy Agar (TSA, Difco/Becton-Dickinson, Sparks, MD, EUA) com 5% de sangue ovino a 37°C sobre atmosfera com 5% de CO₂ durante quatro dias e ressuspensa em tampão salina-fosfato, PBS (0,01M PO₄⁻, 0,01M NaCl, pH 7,2) a uma concentração de 1x 10¹¹ UFC/ml para o preparo do inóculo usado nos camundongos.

Infecção dos camundongos:

Camundongos fêmeas BALB/c ByJ com idade entre 6 a 8 semanas obtidos do Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA) foram utilizados nos experimentos após uma semana de adaptação. Os animais foram mantidos em caixas em um biotério com nível de biossegurança 3.

Em um experimento piloto, 12 camundongos mantidos em jejum por 16 horas e metade recebeu 0,1 ml de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 10% 10 minutos antes da administração do inóculo para a neutralização da acidez gástrica. A outra metade recebeu PBS como controle. Os camundongos foram necropsiados 1 dia pós inoculação (dpi). Fragmentos de baço,

fígado e linfonodo mesentérico foram coletados para contagem bacteriana.

Grupos de cinco (tempos 0,3, 3, 14 e 21 dpi) ou dez (tempos 1 e 7 dpi) camundongos foram inoculados via intragástrica por sonda com 0,1 ml de PBS contendo aproximadamente 1x10¹⁰ UFC de *B. melitensis* 16M e cinco camundongos controles não infectados foram inoculados com PBS. Os camundongos inoculados foram eutanasiados a 0,3, 1, 3, 7, 14 e 21 dias utilizando anestésico inalatório seguido por deslocamento cervical. Durante a necropsia, sangue, fragmentos de baço, fígado, linfonodos cervicais, axilares, inguinais e mesentéricos, placas de Peyer, íleo, colon e ceco foram coletados em PBS estéril para bacteriologia. Fragmentos de baço, fígado, íleo com placa de Peyer e cólon foram também coletados em formalina tamponada a 10% para histopatologia e imunoistoquímica. Fragmentos de baço e íleo foram coletados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA para RT-PCR em tempo real.

Bacteriologia:

Para contagem bacteriana, os tecidos em PBS estéril foram pesados, homogeneizados, diluídos quando necessário e plaqueados. Fígado e baço foram plaqueados em TSA e demais órgãos do trato digestivo foram plaqueados em meio de Farrell (*Brucella Selective Supplement* SR83, Oxoid, Inglaterra), seletivo para *Brucella*. As placas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ e a contagem de UFC foi realizada após 4 dias.

Histopatologia e imunoistoquímica:

Os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% por 24 horas, desidratados em álcool em concentração crescente 70 a 100%, diafinizados em xilol e embebidos em parafina. Os segmentos foram seccionados a

5 µm de espessura e corados pela técnica rotineira de hematoxilina e eosina para avaliação histológica.

Os fragmentos dos tecidos também foram processados para imunistoquímica conforme o protocolo descrito por Xavier et al. (2009). Secções de 5µm foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para o bloqueio de peroxidase endógena. Após lavagem em PBS, os cortes foram bloqueados para ligação inespecífica do anticorpo com 0,5% de leite desnatado em pó por 45 minutos seguida de uma incubação com anticorpo primário monoclonal anti-*B. melitensis* (1:100) por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes em PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos, lavado três vezes e incubado com complexo estreptoavidina-peroxidase (LSAB+ Kit, DAKO Corporation, CA, EUA) por 20 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. A reação foi revelada usando uma solução de dianobenzidine (DAB, Dako) e os cortes contracolorados com hematoxilina de Mayer. A localização das bactéria imunomarcadas foi determinada nos tecidos avaliados.

Extração de RNA total e RT-PCR quantitativo:

A extração do RNA total dos tecidos, íleo e baço, foi realizada utilizando Tri-reagent (Molecular Research Centre, Cincinnati, OH, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, fragmentos de tecidos foram homogeneizados e lisados em 1ml de Tri-reagent com auxílio de pestilo descartável por 5 minutos. No tubo mantido em gelo foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio e misturado vigorosamente. As amostras foram centrifugadas para separação das fases orgânicas. O sobrenadante foi

retirado e 0,5 ml de isopropanol foi adicionado a ele. Após 10 minutos no gelo, amostra foi centrifugada para obtenção do precipitado de RNA. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% e ressuspenso com água livre de RNases. Posteriormente o RNA total foi purificado usando *DNA-free kit* (Ambion, Austin, Texas, EUA) e quantificado por espectrofotometria.

O cDNA foi preparado usando 500 ng de RNA total de cada amostra usando *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA). O RNA purificado foi misturado a 5 µl de Tampão 10X, 11 µl de 25 mM MgCl₂, 10 µl de dNTPs, 2,5 µl de random hexamers primers, 1 µl of inibidor de RNase, 1,25 µl de Transcriptase reversa e água suficiente para volume final de 50 µl. A transcrição reversa foi realizada em incubação prévia a 25°C por 10 minutos seguida por extensão a 48°C por 30 minutos e inativação 95°C por cinco minutos. O PCR em tempo real foi realizado usando 4 µl de cDNA, 300 nM de cada par de iniciadores e *SYBR Green PCR master mix* (Applied Biosystems). A reação foi realizada no termociclador *ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante. Os dados obtidos foram analisados usando método de CT comparativo (Livak e Schmittgen, 2001). A variação na magnitude da expressão gênica no tecido do camundongo infectado foi normalizada através da expressão de GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase) e calculada em comparação aos níveis de expressão do gene nos camundongos controle. Os genes avaliados e seus respectivos iniciadores usados neste estudo estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores usados no RT-PCR quantitativo.

Gene	Par de iniciadores
GAPDH ¹	5'TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA3' 5'AGGTCGGTGTGAACGGATTTG3'
IL-6 ²	5'GAGGATACTACTCCCAACAGACC3' 5'AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA3'
MIP-3 α ³	5'CCAGGCAGAAGCAAGCAACT3' 5'TCGGCCATCTGTCTTGTGAA3'
MIP-2 ⁴	5'AGTGAAGTGCCTGTCAATGC3' 5'AGGCAAACCTTTTGACCGCC3'
KC ⁵	5'TGCACCCAAACCGAAGTCAT3' 5'TTGTGAGAAGCCAGCGTTCAC3'
iNOS ⁶	5'TTGGGTCTTGTTCCTCCACGG3' 5'CCTCTTTCAGGTCCTTTGGTAGG3'
IFN γ ⁷	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
TNF α ⁸	5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3' 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'

¹Gliceraldeído Fosfato Dehidrogenase, ²Interleucina-6, ³Proteína Inflamatória de Macrófagos 3 alfa, ⁴Proteína Inflamatória de Macrófagos 2, ⁵Quimiocinas de Neutrófilos, ⁶Oxido Nítico Sintetase indutível, ⁷Interferon gama, ⁸Fator de necrose tumoral alfa.

Análise estatística:

Os dados expressos em UFC foram logaritmicamente transformados e expressos em média aritmética e desvio padrão. Os dados de magnitude de alteração na expressão gênica foram também logaritmicamente transformados e expressos em médias geométricas e desvio padrão. Os resultados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste T de Student não pareado. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Com o objetivo de estudar a cinética da infecção por *B. melitensis* através do trato gastrointestinal de camundongos e considerando que a sobrevivência de *B. melitensis* pode ser afetada pelo baixo pH

gástrico, um experimento piloto utilizou 12 camundongos BALB/c fêmeas que foram inoculadas intragastricamente com 10^{10} UFC de *B. melitensis* 16M com ou sem a pré-administração de uma solução a 10% de bicarbonato de sódio para neutralizar a acidez gástrica. Nenhuma diferença significativa na contagem de colônias bacterianas foi detectada nos linfonodos mesentéricos, baço ou fígado entre os grupos pré-tratados e não tratados após 24 horas de infecção (Tabela 2), indicando que a neutralização da acidez gástrica não é necessária para o estabelecimento da infecção sistêmica com *B. melitensis* em camundongos através da via intragástrica.

Tabela 2. Média e desvio padrão da contagem bacteriana em órgãos de camundongos infectados com 10^{10} UFC de *B. melitensis* 16M com ou sem a pré-administração de 10% NaHCO_3 .

Tratamento prévio	baço	fígado	LM ¹
PBS (n=6)	$2,30 \pm 2,11^2$	$1,10 \pm 1,09$	$1,42 \pm 0,37$
NaHCO_3 (n=6)	$1,04 \pm 1,43$	$0,72 \pm 0,67$	$1,53 \pm 0,24$

¹ Linfonodo mesentérico

² Log de UFC

A cinética de colonização e invasão através do trato digestivo foi então caracterizada pela infecção via sonda gástrica de camundongos BALB/c fêmeas com 1×10^{10} UFC de *B. melitensis* 16M. A colonização bacteriana no íleo, cólon, ceco, placas de Peyers, linfonodo mesentérico, baço e fígado foi determinada após 8 horas, 1, 3, 7, 14 e 21 dias após infecção. Embora 1×10^{10} UFC por animal possa ser considerado uma dose de inóculo elevada, esta dose foi escolhida com intuito de obter uma colonização mais consistente dos tecidos, particularmente nos estágios iniciais da infecção, que é crucial para caracterizar a disseminação de *B. melitensis* do trato digestivo para os sítios sistêmicos de infecção.

Como mostra a Figura 1, número elevado de UFC de *B. melitensis* foi recuperado do cólon e ceco às 8 horas após infecção (0,3 dpi). Estes números rapidamente diminuíram nos tempos subsequentes embora pequena quantidade de bactéria continuou ainda a ser

isolada no intestino grosso até 21 dpi. No íleo, declínio menor no número de UFC foi observado durante o curso da infecção sem diferença significativa entre os tempos. Esta ausência na diferença estatística reflete uma alta variação no número de UFC que é recuperado do íleo entre os animais após infecção. Nas placas de Peyer, uma pequena quantidade de bactéria foi recuperada durante todo o período embora com um aumento significativo do número de UFC a 7 e 14 dpi, qual retorna para uma quantidade abaixo do limite de detecção a 21 dpi, indicando que a colonização das placas de Peyer foi transitória. Por outro lado, pequeno número de UFC foi cultivado dos linfonodos mesentéricos, baço e fígado aos 0,3 e 1 dpi. A quantidade de bactéria nestes órgãos aumentou significativamente aos 3 e 7 dpi e estabilizou aos 14 e 21 dpi. A bactéria foi também re-isolada no sangue e nos linfonodos cervicais superficiais e axilares em alguns animais ao longo do curso de infecção (Tabela 3).

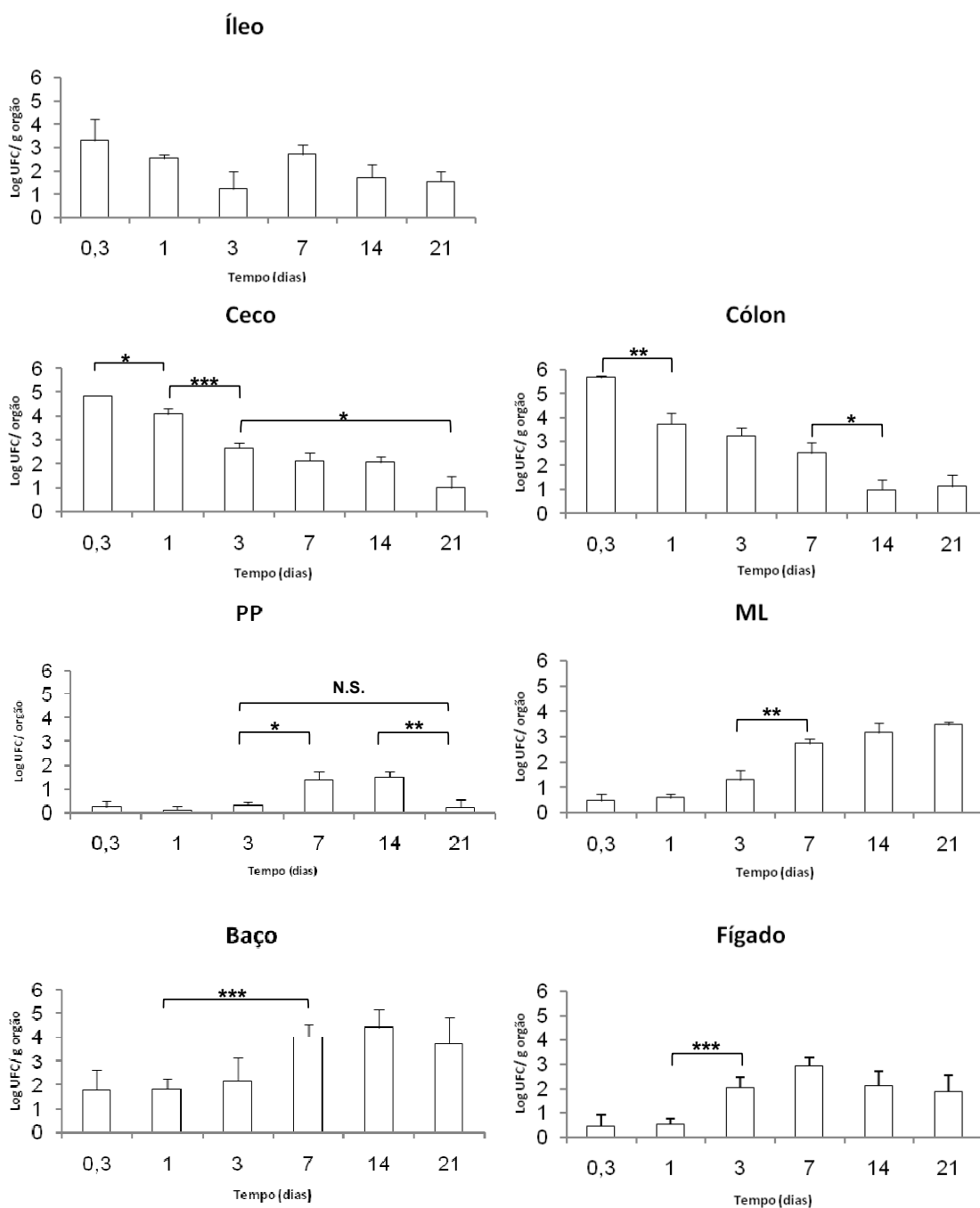


Figura 1. Cinética da infecção por *Brucella melitensis* em camundongos pelo trato digestivo. Fragmentos de íleo, cólon, ceco, placas de Peyer (PP), linfonodo mesentérico (LM) baço e fígado foram homogeneizados em PBS e plaqueados para contagem bacteriana aos 0,3, 1, 3, 7, 14 e 21 dpi. A diferença significativa entre os tempos de infecção está indicada por asterisco (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). N.S. é não significativo. Os dados estão representados por média aritmética e erro padrão de cinco ou dez (1 e 7 dpi) camundongos por cada tempo.

Tabela 3. Número de animais positivos à bacteriologia de sangue, linfonodos cervicais superficiais e axilares de camundongos infectados intragastricamente com *Brucella melitensis* (n=5).

Tecido	Dias após infecção					
	0,3	1	3	7	14	21
sangue	0	2	0	2	0	3
LC ¹	NA ³	0	1	4	4	3
LA ²	NA	0	0	0	2	2

¹ Linfonodos cervicais superficiais

² Linfonodos axilares

³ Não avaliado

A resposta inflamatória durante infecção por *Brucella* tem sido caracterizada no baço de camundongos inoculados via intraperitoneal. IFN γ , TNF α e iNOS apresentam um aumento na expressão de RNAm no baço de camundongo durante infecção por *Brucella* (Pasquali et al., 2001; Roux et al., 2007). Células do baço de camundongos infectados via gastrointestinal apresentaram um perfil semelhante da expressão de RNAm destes genes inflamatórios (Figura 2).

Para investigar se *B. melitensis* induz uma resposta inflamatória no intestino durante a infecção gastrointestinal, a expressão de quimiocinas e citocinas proinflamatórias foi verificada através do RT-PCR em tempo real em íleo de camundongo aos 1, 3 e 7 dpi como demonstrado na Figura 3. A expressão de IL-6 e das quimiocinas, proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) proteína inflamatória de macrófago 3 alfa (MIP-3 α), quimiocina de neutrófilos (KC), não alterou significativamente ao longo do curso de infecção. Enquanto IL-6 e KC não apresentaram nenhum aumento na expressão em comparação com animais não infectados, MIP-2 e MIP-3 α tiveram aumento de aproximadamente 4 vezes na amplitude de expressão em todos os tempos avaliados. A expressão de iNOS aumentou significativamente ($p=0,05$) aos 3 dpi, mas apresentando apenas um aumento discreto de aproximadamente 6 vezes quando comparado aos animais não infectados.

Para caracterizar as lesões inflamatórias causadas pela *B. melitensis* no intestino de camundongos intragastricamente infectados, secções do íleo com uma placa de Peyer, cólon, fígado e baço foram histologicamente avaliados e a localização *in situ* da bactéria determinada por imunistoquímica. Não foi observada nenhuma inflamação nos fragmentos de íleo e cólon avaliados ao longo do curso de infecção (Figura 4ab). Em alguns camundongos havia rara exocitose de neutrófilos na mucosa ileal. Grau variável de hiperplasia linfóide foi observado nas placas de Peyer. A ausência de lesões induzidas por *B. melitensis* no intestino está de acordo com o perfil de expressão de RNAm de quimiocinas e citocinas, que é caracterizado por aumento muito discreto. *B. melitensis* imunomarcada foi raramente observada no citoplasma de células inflamatórias mononucleares na lâmina própria. Alterações inflamatórias no baço foram caracterizadas por focos discretos de infiltrado neutrofilico e histiocitose discreta a moderada na zona marginal e microgranulomas (Figura 4c). *B. melitensis* imunomarcadas foram raramente detectadas dentro de macrófagos na polpa vermelha. No fígado, granulomas múltiplos compostos por macrófagos, linfócitos e raros neutrófilos foram observados (Figura 4d). Embora o método de imunistoquímica seja uma ferramenta útil para determinar a localização da *Brucella* nos tecidos de outras espécies animais, neste estudo houve detecção precária de *B. melitensis* imunomarcadas devido à sensibilidade analítica menor deste

método em tecidos de camundongos como previamente descrito (Meador et al., 1986).

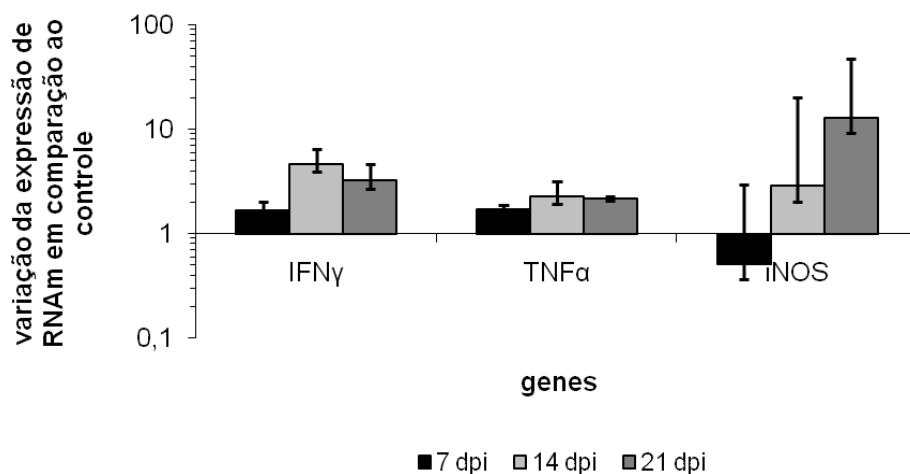


Figura 2. Expressão de RNAm de genes proinflamatórios no baço de camundongos infectados com *Brucella melitensis* aos 7, 14 e 21 dpi em comparação a animais controles não infectados medido pelo RT-PCR em tempo real. Os dados estão representados por média geométrica e erro padrão de cinco camundongos por cada tempo. IFN γ (Interferon gama), TNF α (Fator de necrose tumoral alfa), iNOS (Oxido Nítico Sintetase indutível).

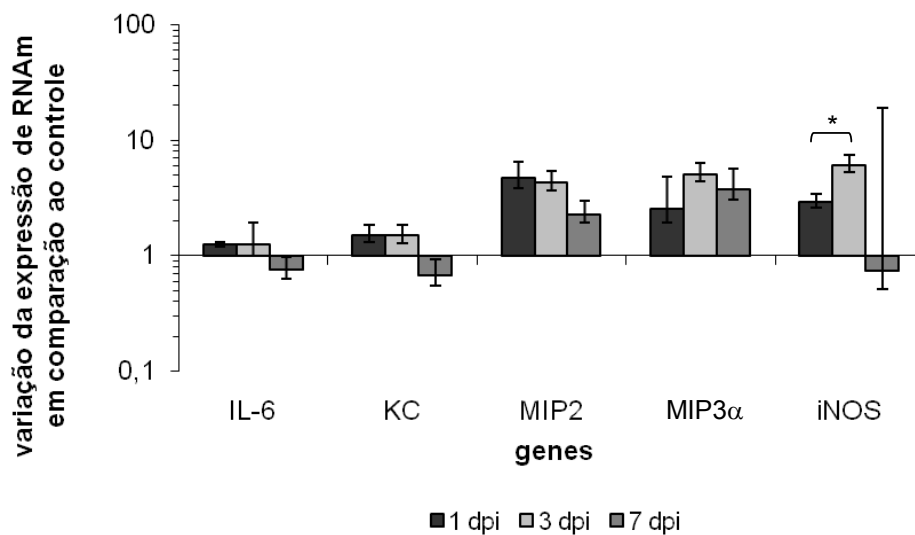


Figura 3. Expressão de RNAm de genes proinflamatórios no íleo de camundongos infectados com *Brucella melitensis* aos 1, 3 e 7 dpi em comparação a animais controles não infectados medido pelo RT-PCR em tempo real. * p=0.05. Os dados estão representados por média geométrica e erro padrão de cinco camundongos por cada tempo. IL-6 (Interleucina-6), KC (Quimiocinas de Neutrófilos), MIP-2 (Proteína Inflamatória de Macrófagos 2), MIP-3 α (Proteína Inflamatória de Macrófagos 3alfa), iNOS (Oxido Nítico Sintetase indutível).

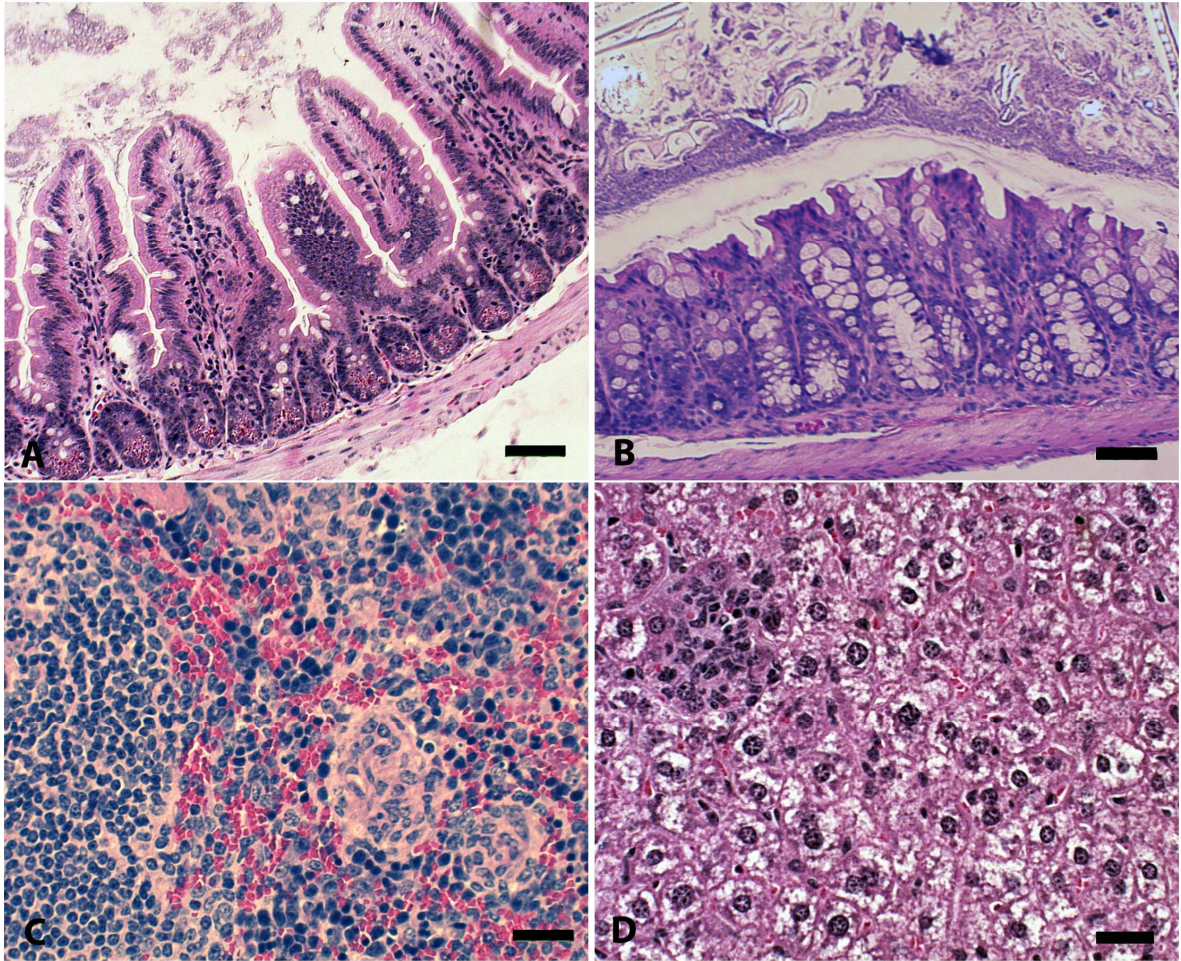


Figura 4: Fotomicrografia de órgãos de camundongos infectados com *Brucella melitensis* aos 21 dias de infecção. Íleo (A) e cólon (B) sem alterações histológicas significativas. HE. Barra 600 μm . Baço (C) com múltiplos microgranulomas na polpa branca e fígado (D) com microgranuloma focal constituído predominantemente de macrófagos e poucos neutrófilos. HE. Barra 300 μm .

Discussão

Embora o trato digestivo seja reconhecido como o sítio de entrada mais importante na brucelose humana e também nos animais domésticos, existe número reduzido de estudos investigando a infecção por *Brucella* através desta via (Pasquali et al., 2003, Bandara et al., 2007, Delpino et al., 2007; Sangari et al., 2007; Izadjoo et al., 2008). Este estudo estabeleceu um modelo animal de infecção gastrointestinal por *B. melitensis* demonstrando a cinética de infecção até 21 dias após inoculação intragástrica em camundongos.

O trato digestivo é um ambiente restritivo a colonização e multiplicação de microorganismos patogênicos. Há vários fatores limitantes como acidez gástrica, sais biliares, peptídeos antimicrobianos, anticorpo de mucosa, barreira epitelial, microbiota intestinal, resposta imunológica local (Borriello, 1984; Magalhães et al., 2007). Por esta razão, a *Brucella* deve ser hábil em resistir a este ambiente hostil para conseguir atingir seu nicho intracelular e estabelecer infecção sistêmica através do trato digestivo. Através da caracterização da cinética de infecção por *B. melitensis* pelo trato digestivo, foi demonstrado que a bactéria pode resistir ao trato digestivo e sobreviver em número pequeno, mas significativo (em torno de 100 UFC bactérias/g de tecido) até 7 dpi no intestino, permitindo tempo suficiente para atingir as células e vasos na submucosa intestinal e disseminar sistemicamente. Embora não tenha sido feita nenhuma distinção entre bactérias presente no lume e no tecido, estes resultados sugerem colonização de células, presumivelmente macrófagos e células dendríticas na lâmina própria e de folículos linfóides intestinais.

Estudos prévios sugerem que após a entrada por via oral, a *Brucella* é internalizada por células M no intestino e fagocitada por

macrófagos e células dendríticas na lâmina própria (Ackermann et al., 1988; Salcedo et al., 2008). A partir deste ponto, a bactéria atinge o linfonodo regional de onde se multiplica e dissemina para outros tecidos. Neste trabalho foi demonstrado que *B. melitensis* consistentemente atinge linfonodos mesentéricos e sítios sistêmicos em tempos de infecção semelhantes, sugerindo que a colonização sistêmica possivelmente ocorra através de vasos sanguíneos e provavelmente independente da colonização dos linfonodos mesentéricos. A colonização de órgãos sistêmicos simultaneamente a colonização de linfonodos mesentéricos, também tem sido demonstrada na infecção com bactérias enteropatogênicas como *Yersinia pseudotuberculosis* em camundongos (Barnes et al., 2006). Interessantemente, neste estudo a bactéria foi detectada no sangue em diferentes tempos de infecção sugerindo uma consistente bacteremia no camundongo. Em humanos, a *Brucella* pode causar um bacteremia inicial e transitória, seguida por invasão de células fagocíticas e reaparecimento no sangue em baixo número, seja continuamente ou intermitentemente (Pappas e Papadimitriou, 2007).

A *Brucella* não é considerada um patógeno capaz de causar inflamação intestinal. Embora existam alguns relatos de inflamação do trato gastrointestinal causada por *Brucella* em humanos (Petrella e Young, 1988; Jorens et al., 1991; Potasman et al., 1991; Stermer et al., 1991; Mazokopakis et al., 2008). Neste estudo ficou demonstrado que *B. melitensis* atravessa o intestino para os sítios sistêmicos sem causar nenhuma inflamação no trato digestivo. Não houve expressão de KC e somente indução discreta da expressão de MIP-2 e MIP-3 α no íleo. KC e MIP-2 são quimiotáticos para polimorfonucleares como neutrófilos enquanto MIP-3 α é um fator quimiotático de linfócito T. Todas essas quimiocinas podem ser produzidas por macrófagos e células

dendríticas em resposta a infecção por vários patógenos (Jenner e Young, 2005). Outros genes inflamatórios como IL-6, IL-12 e IL-10 não tiveram aumento na expressão. Adicionalmente, neste estudo não foi observado nenhum influxo de neutrófilo e nenhuma alteração histopatológica significativa no íleo ou cólon. Por outro lado, as lesões histopatológicas observadas no baço e fígado, incluindo infiltrado neutrofílico e microgranulomas foram semelhantes às lesões previamente descritas em camundongos infectados por outras vias de infecção (Enright et al., 1990; Mense et al., 2001).

A ausência de resposta inflamatória induzida por *Brucella* no intestino pode ter duas explicações plausíveis. Primeiro, a *Brucella* é considerada uma bactéria furtiva que evita a ativação da resposta imunológica inata durante o estabelecimento da infecção (Barquero-Calvo et al., 2007; Carvalho Neta, et al., 2008; Cirl et al., 2008; Salcedo et al., 2008). A ausência de resposta pró-inflamatória tem sido demonstrada durante infecção por *B. abortus* em camundongos (Barquero-Calvo et al., 2007). Além disso, *B. abortus* é capaz de suprimir a resposta proinflamatória das células trofoblásticas bovinas (Carvalho Neta, et al., 2008). Consequentemente, em concordância com

estudos prévios, este estudo demonstrou que *B. melitensis* pode invadir através do trato digestivo sem induzir inflamação local. Por outro lado, a ausência de resposta inflamatória intestinal neste caso também pode ser atribuída ao fato de que um trato digestivo saudável tem um estado inflamatório particular qual é responsável em manter a homeostase com as bactérias comensais. Somente patógenos enteropatogênicos são capazes de quebrar esta barreira intestinal, estimulando resposta inflamatória local (Magalhães et al., 2007; Fukata e Abreu, 2007).

Enfim, embora brucelose humana seja uma doença oriunda de alimentos contaminados, não se espera uma inflamação intestinal durante infecção oral fato que provavelmente contribui para a disseminação e estabelecimento da infecção sistêmica crônica. O modelo animal de infecção por *Brucella* em camundongo tem sido fortemente baseado na inoculação intraperitonal qual é obviamente uma via não natural de infecção. Por esta razão, a mimetização de sítos de entrada natural de infecção, como trato gastrintestinal, é necessária para melhor entendimento dos fatores do patógeno e do hospedeiro envolvidos no estabelecimento da doença.

CAPITULO 3: REQUERIMENTO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA: UREASE, LPS E SST4 DURANTE INFECÇÃO POR *B. MELITENSIS* PELO TRATO DIGESTIVO.

Objetivos

Investigar o requerimento da urease, SST4 e LPS da *B. melitensis* para o estabelecimento da infecção pelo trato digestivo em camundongos.

Material e métodos

Geração de amostras mutantes e técnica de DNA recombinante:

O requerimento da urease, SST4 e LPS no estabelecimento da infecção de *B. melitensis* pelo trato digestivo em camundongos foi acessado pela construção de amostras de *B. melitensis* carregando deleção de *ureA*, *ureB* e *ureC* do operon *ure1*, deleção polar do *virB2*, ou rompimento do *pmm* (*phosphomanomutase*), denominadas *BM Δ ure1*, *BM Δ virB2*, *BM Δ pmm*, respectivamente, foram construídas como detalhado abaixo.

Para geração da amostra *BM Δ ure1*, foi construído um plasmídeo que gerou uma deleção marcada das subunidades $\alpha\beta\gamma$ codificadas pelos genes *ureC*, *ureB* e *ureA*, respectivamente, do operon *ure1* (BMEI 1652-1654, número de acesso GenBank NC003317). Segmentos anteriores e posteriores a *ure1* foram amplificados pela PCR utilizando os iniciadores BM1652upF-BM1652upR e BM1654dnF-BM1654dnR, respectivamente (Tabela 4). Os produtos de PCR foram clonados no vetor pCR2.1 TOPO usando o kit de clonagem TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O segmento anterior foi cortado por dupla digestão enzimática com *XbaI* e *EcoRI* e clonado em pBluescript KS (Stratagene, CA,

EUA). O segmento posterior foi então cortado com enzimas *EcoRI* e *SalI*, e clonado dentro do mesmo plasmídeo. Posteriormente, um cassete de kanamicina *Tn903* oriundo do pUC4-KSAC (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemanha) foi digerido por *EcoRI* e clonado entre os segmentos anterior e posterior gerando o plasmídeo final pUR. A sequência e a direção correta dos fragmentos clonados foram verificadas por sequenciamento. O pUR foi introduzido por eletroporação na *B. melitensis* 16M e clones com resistência a kanamicina e sensibilidade a carbenicilina foram selecionados. A deleção da *ureC*, *B*, *A* do cromossomo I da *B. melitensis* foi confirmado por *Southern blot*. Adicionalmente, a perda da atividade da urease pela amostra mutante foi confirmada pelo Urease Test Broth (Difco).

Uma vez que o operon *virB* é 100% conservado entre *B. abortus* e *B. melitensis*, um plasmídeo construído previamente pAV2.2 (den Hartigh et al., 2004), baseado na sequência genômica da *B. abortus*, foi usado para obter uma amostra mutante de *B. melitensis* carregando uma deleção do *virB2*. O pAV2.2 é um pBluescript KS com produtos de PCR da sequência *virB988-1562* and *virB1796-2458* da *B. abortus* (número de acesso GenBank AF226278) separados por um cassete de resistência a kanamicina. Este plasmídeo foi introduzido por eletroporação dentro da *B. melitensis* 16M e clones com resistência a kanamicina e sensibilidade a carbenicilina foram selecionados. A deleção do *virB2* do cromossomo II da *B. melitensis* foi confirmado por *Southern blot*.

Para a construção da amostra com LPS rugoso de *B. melitensis*, um plasmídeo construído previamente, pNH1.3 baseado na sequência genômica de *B. abortus* foi usado. Este plasmídeo gera rompimento do gene *phosphomannomutase* seja na *B. abortus* ou *B. melitensis* (*pmm* número de acesso

GenBank BAB2_0855 para *B. abortus* ou BMII 0899 para *B. melitensis*) e consequentemente a não produção ou produção proteína truncada. O pNH1.3 é um pBluescript KS com produto de PCR correspondente a fragmento interno do *pmm* usando iniciadores PMM355F e PMM610R (Tabela 4). Este plasmídeo foi introduzido

por eletroporação na *B. melitensis* 16M e clones com resistência a carbenicilina foram selecionados. O fenótipo mutante de LPS rugoso foi confirmado através da coloração pelo cristal violeta. Todas as amostras de bactéria usadas ou geradas neste trabalho, bem como plasmídeos e iniciadores, estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Lista das mostras de bactéria, plasmídeos e iniciadores usados no experimento.

	Nome	Descrição
Amostras de bactéria	16M	<i>B. melitensis</i> amostra virulenta
	TAP1 (BM Δ virB2)	<i>B. melitensis</i> Δ virB2::kan
	TAP4 (Δ ure1)	<i>B. melitensis</i> Δ ure1::kan
	TAP5 (Δ pmm)	<i>B. melitensis</i> Δ pmm::amp
	DH5 α	Amostra de <i>E. coli</i> usada para clonagem
plasmídeos	pCR2.1-TOPO	vetor de clonagem TA
	pBluescript KS	vetor de clonagem
	pUC4-KSAC	Plasmídeo com cassete de resistência a kanamicina <i>Tn903</i>
	pUR	Produto de PCR do ure1703818-1704817 e ure1707273-1708272 separados por <i>Tn903</i> dentro pBluescript KS.
	pAV2.2 pNH1.3	Produto de PCR do <i>virB988-1562</i> e <i>virB1796-2458</i> separados por <i>Tn903</i> dentro pBluescript KS Produto de pmm355-610 dentro de pBluescript KS.
iniciadores	BM1652upF	<u>TCTAGAGGCTTGCAGGAGATTGAT</u> XbaI*
	BM1652upR	<u>GAATTCGCCGAGTATGAGATATG</u> EcoRI*
	BM1654dnF	<u>GAATTCGGCGGCCATCGCGATCAA</u> EcoRI*
	BM1654dnR	<u>GTCGACCGTCAACGGGACCGGTGA</u> Sall*
	PMM355F	GCTCCACCGAAACCGATGC
	PMM610R	TCGCTTTTGCCCCATTGG

* sítios de restrição enzimática estão grifados na sequência dos iniciadores.

Eletroporação:

A eletroporação foi realizada segundo protocolo previamente descrito (Lai et al., 1990) O precipitado de *B. melitensis* cultivada em Tryptic Soy Broth (TSB, Difco/Becton-Dickinson) por 12 horas a 37°C foi lavado 3 vezes com água estéril gelada para tornar a bactéria eletricamente competente. 50 μ l de *B. melitensis* competente foi eletroporada com 1 ng de plasmídeo final a 2,20 KV e 5,40 ms, utilizando cubetas para eletroporação de 0,1 cm e eletroporador Bio-Rad (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, EUA). Placas de

ágar infusão de batata com antibióticos apropriados foram utilizadas para selecionar colônias candidatas a amostras mutantes. Carbenicilina 100 mg/l ou kanamicina 100 mg/l foram adicionadas ao meio quando necessário. Todos os experimentos com *Brucella* viva foram realizados sob condições de biossegurança de nível 3.

Southern blot:

O DNA genômico de *B. melitensis* 16M e das amostras candidatas a mutantes selecionadas foram extraídos e digeridos com *EcoRI* ou *FspI* e resolvidos em gel de

agarose a 0,8% a 90 Volts. O gel foi depurado com solução 0,25M HCl e desnaturado com solução 1,5M NaCl e 0,5M Tris e os fragmentos de DNA transferidos por capilaridade para membrana de nylon carregada positivamente. Posteriormente, os fragmentos de DNA foram imobilizados na membrana através da exposição à radiação ultra violeta (comprimento de onda 254 nm) e desnaturados com tampão 2x SSC (3M NaCl, 0,3M Citrato Trissódico.2H₂O). As sondas do DNA alvo marcadas com fluoreceína foram construídas por reação de PCR utilizando kit com iniciadores randômicos marcados (*Fluorescein-High Prime* - Roche Applied Science, Indianápolis, EUA). As sondas foram então hibridizadas com a membrana e a ligação revelada com reagente quimioluminescente (*DNA Chemiluminescence Reagent*, PerkinElmer Life Sciences, Boston, EUA).

Análise qualitativa da atividade enzimática da urease:

As amostras *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M e *BMAurel* foram cultivadas por 72 horas em TSB a 37°C sob agitação. 50 µl da cultura foi usada para inocular 5 ml de *Urease Test Broth* (Difco) que foi incubado a 37°C sob agitação. Alteração na cor do *Urease Test Broth* foi verificada após 8, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. A cor rosa indica que a atividade da urease está presente. Amostra *B. suis* 1330 foi utilizada como controle positivo. Um *Urease Test Broth* não inoculado foi usado como controle negativo.

Coloração cristal violeta:

Colônias individuais de *Brucella* em placas de TSA foram submersas em solução de Cristal Violeta a 0,05% por 1 minuto e examinadas após a remoção do cristal violeta. Colônias de *Brucella* com LPS rugoso coram de roxo enquanto as com LPS liso não coram.

Condições de cultivo:

Brucella melitensis amostra virulenta 16M e amostras mutantes isogênicas foram cultivadas em placas TSA (Difco) com 5% de sangue ovino a 37°C sobre atmosfera com 5% de CO₂ durante quatro dias e ressuspensa em PBS a uma concentração de 1x 10¹¹ UFC/ml para o preparo do inóculo usado nos camundongos. Amostras também foram cultivadas em TSB (Difco) a 37°C sob agitação para os experimentos *in vitro*.

Infecção dos camundongos:

Grupos de cinco (amostras mutantes) ou dez (amostra 16M) camundongos fêmeas BALB/c ByJ com idade entre seis a oito semanas foram inoculados via intragástrica por sonda com 0,1 ml de PBS contendo aproximadamente 1x10¹⁰ de *B. melitensis* 16M virulenta ou amostra isogênica mutante. No experimento de infecção mista, grupos de cinco camundongos foram inoculados intragasticamente por uma sonda com 0,1 ml de PBS contendo aproximadamente 2 x 10¹⁰ UFC de uma mistura 1:1 de amostra virulenta 16M e uma das amostras mutantes. Os índices de competitividade foram calculados como log (UFC da amostra mutante/ UFC da amostra virulenta) e ajustada em cada caso para a razão entre o inóculo da amostra mutante e amostra 16M. Com infecção mista a variação individual é inexistente durante a comparação entre amostra virulenta e mutante.

Bacteriologia:

Para quantificação bacteriana, os tecidos em PBS estéril foram pesados, homogeneizados, e plaqueados. Fígado e baço foram plaqueados em TSA com ou sem antibiótico e demais órgãos do trato digestivo foram plaqueados em meio seletivo para *Brucella*, meio de Farrell ou TSA com antibiótico. Placas sem antibióticos foram usadas para isolar amostra 16M e placas com antibiótico apropriado para amostras mutantes. As placas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ e a contagem de UFC foi realizada após

quatro dias. No caso do experimento de infecção mista mesmo volume do homogeneizado do tecido foi plaqueado em placas TSA (baço e fígado) ou Farrel (intestino e LM) e em TSA com antibiótico apropriado para determinar o índice de competitividade. A contagem bacteriana em placas TSA ou Farrel representaram todas as amostras de *B. melitensis* presentes no tecido e as colônias isoladas na placa de TSA com antibiótico eram as amostras mutantes. A diferença entre as placas representou o número de UFC da amostra virulenta 16M.

Susceptibilidade a baixo pH *in vitro*:

O pH da solução PBS foi ajustada para pH 2, 4 ou 7 pela adição de 1N HCl. Soluções de PBS com pH diferente foram inoculadas com 1×10^9 UFC/ml de amostra 16M ou mutantes e incubadas a 37°C. Após 30 minutos de incubação, diluição seriada de cada solução foi plaqueada em TSA para contagem bacteriana.

Susceptibilidade *in vitro* a sais biliares:

A susceptibilidade das amostras de *B. melitensis* a sais biliares foi testada de acordo com Delpino et al. (2007). Amostras virulenta e mutantes foram cultivadas em TSB até atingir fase de crescimento exponencial e então ressuspensas em 5 ml de TSB com 0%, 5% ou 10% de bile bovina (*Oxgall*, USBiological, Massachusetts, EUA) na concentração de 1×10^8 UFC/ml. Soluções são incubadas a 37°C sob agitação

por 18 horas e diluição seriada de cada solução foi plaqueada em TSA para contagem bacteriana.

Análise estatística:

Os dados expressos em UFC foram logaritmicamente transformados e expressos em média e desvio padrão. Os resultados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste T de Student não pareado. Na infecção mista, os dados foram logaritmicamente transformados e as médias comparadas pelo teste T de Student pareado. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

A deleção da *ureCBA* na amostra *BM Δ ure1* foi confirmada por *Southern blot* (Figura 5), e pela perda da atividade da urease pela amostra mutante verificada pelo *Urease Test Broth*. A amostra virulenta 16M alterou a cor do meio com 48 horas enquanto a amostra mutante *BM Δ ure1* não alterou a cor. A deleção do *virB2* na amostra *BM Δ virB2* foi também confirmada por *Southern blot* (Figura 6). A deleção do *pmm* na amostra *BM Δ pmm* foi confirmada pelo fenótipo de LPS rugoso demonstrado pela coloração por cristal violeta. Colônias e *Brucella* com LPS rugoso absorveram e coraram de azul pelo cristal violeta enquanto as com LPS liso não.

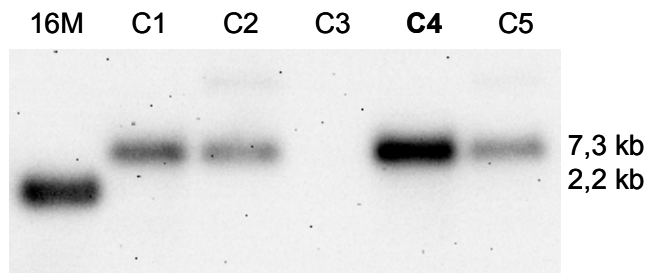


Figura 5. *Southern blot* para confirmação do mutante *BMΔure1*. Colônias selecionadas C1, C2, C4 e C5 foram confirmadas como mutantes. A amostra C4 foi amostra mutante utilizada nos experimentos. DNA genômico digerido com *EcoRI*. A sonda utilizada corresponde a sequência BM1703818-1704817.

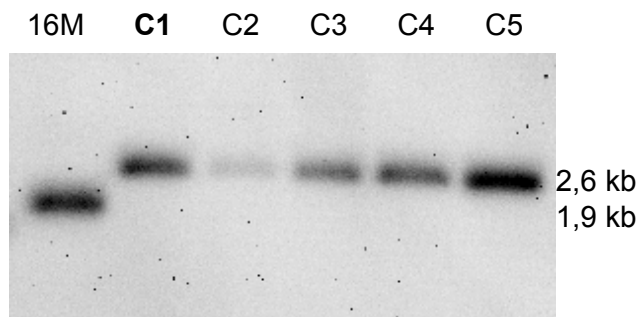


Figura 6. *Southern blot* para confirmação do mutante *BMΔvirB2*. Todas as cinco colônias selecionadas (C1 a C5) foram confirmadas como mutantes. A amostra C1 foi amostra mutante utilizada nos experimentos. DNA genômico digerido com *FspI*. A sonda utilizada foi sequência correspondente a *virB1-3*.

Os camundongos BALB/c foram intragastricamente inoculados com amostra virulenta *B. melitensis* 16M ou com uma das amostras mutantes e a disseminação e multiplicação bacteriana local e sistêmica foram determinadas pela bacteriologia. Contagem bacteriana foi determinada no íleo, linfonodo mesentérico, baço, fígado a 1 e 7 dpi. No 1º dpi, a bactéria foi recuperada em maior número de animais infectados com 16M do linfonodo mesentérico e baço do que em camundongos infectados com mutantes *BMΔvirB2* e *BMΔpmm*, embora o nível de infecção não seja estatisticamente diferente ($p > 0,05$) (Figura 7a). Já no 7º dpi, UFC recuperadas do íleo, linfonodo mesentérico, baço e fígado de camundongos infectados com *BMΔvirB2* and *BMΔpmm*

foram significativamente menor quando comparados aos animais infectados com 16M ($p > 0,05$). Número significativamente menor de UFC da *BMΔure1* foi também recuperado do baço e fígado ($p < 0,05$) como demonstrado na Figura 7b.

O experimento de infecção mista foi realizado para confirmar a atenuação das amostras mutantes pela via intragástrica e resultados similares foram observados para *BMΔvirB2* e *BMΔpmm* (Figura 8cd e 8ef). Menor número de UFC de *BMΔure1* foi recuperado somente no íleo a 1 dpi e no linfonodo mesentérico a 7 dpi (Figura 8ab). Estes resultados indicam que *BMΔvirB2* e *BMΔpmm* são atenuados no baço, fígado e linfonodo mesentérico aos 7 dpi.

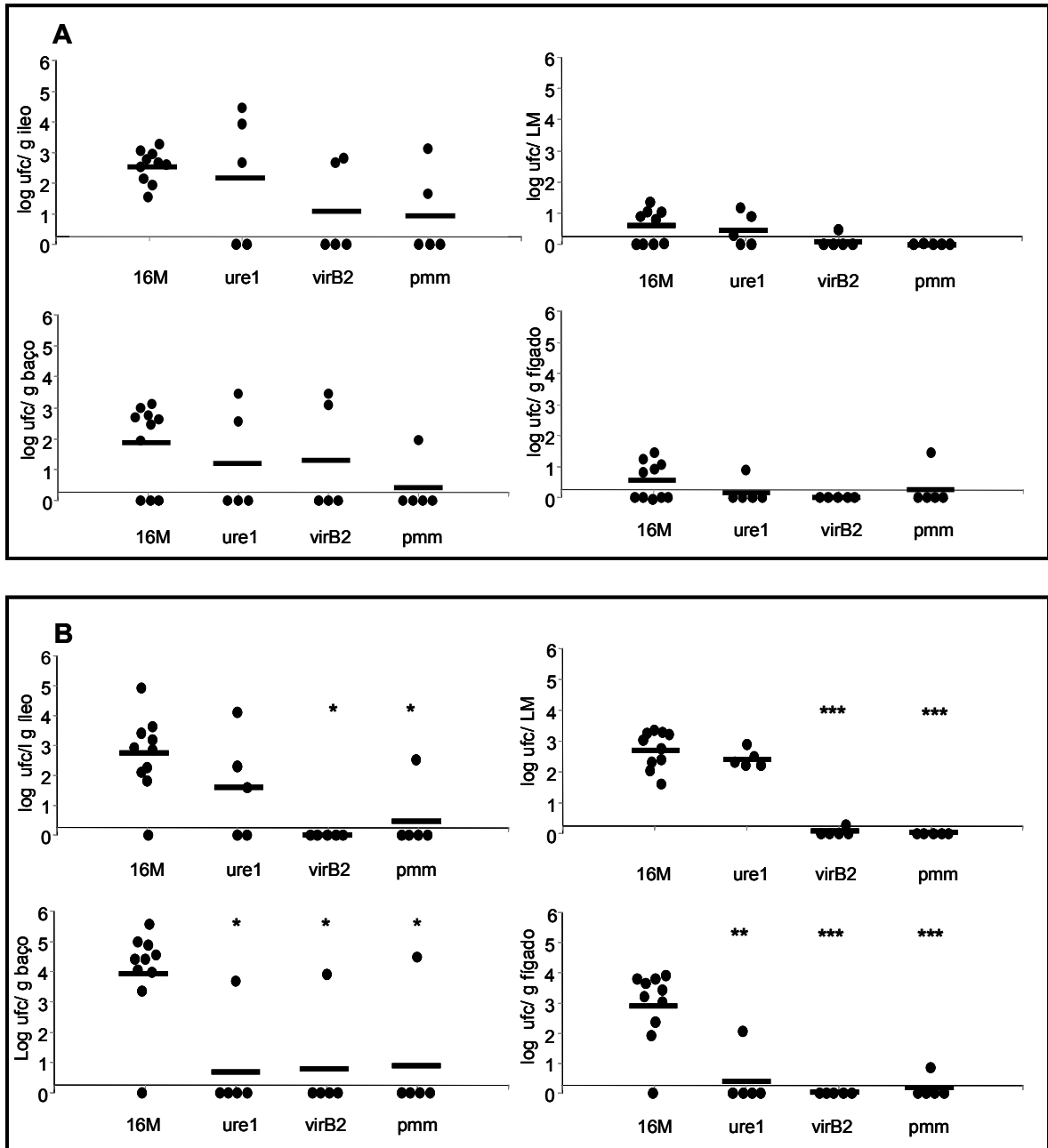


Figura 7. Contagem bacteriana de *Brucella melitensis* em tecidos de camundongos infectados intragastricamente com *B. melitensis* amostra 16M ou amostras mutantes. Fragmentos de ileo, linfonodo mesentérico (LM), baço, fígado foram homogeneizados em PBS e plaqueados para contagem de UFC aos 1dpi (A) e 7 dpi (B). Houve diferença significativa entre os animais infectados com 16M e infectados com amostras mutantes como indicado pelas grades (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Os círculos pretos representam um animal e a linha preta a média aritmética de cinco ou dez (amostra 16M) camundongos a cada tratamento e tempo.

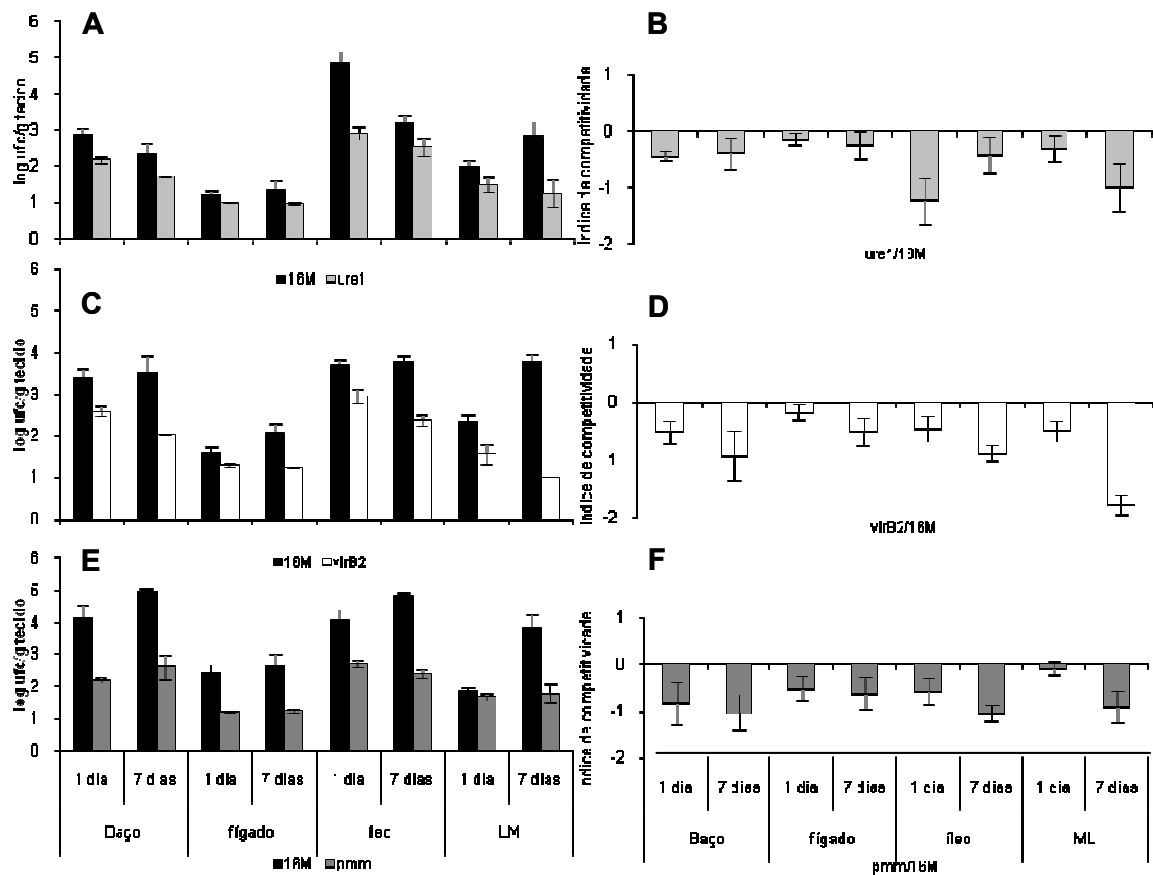


Figura 8. Contagem bacteriana em tecidos de camundongos infectados intragastricamente com suspensão mista (1:1) de *Brucella melitensis* amostra 16M e uma amostra mutante como indicado. Fragmentos de íleo, linfonodo mesentérico (LM), baço, fígado foram homogeneizados em PBS e plaqueados para contagem de UFC aos 1dpi e 7 dpi. Os gráficos A, C e E representam as médias aritméticas e o erro padrão e B, D e F indicam o índice de competitividade da infecção mista, calculada no log (UFC da amostra mutante/UFC da 16M) ajustado para a mesma razão do inóculo.

Acidez gástrica e sais biliares são as principais barreiras para sobrevivência bacteriana no trato digestivo (Borriello et al., 1984). Com objetivo de testar se as deleções do *virB2*, *ureI* ou *pmm*, resultaram em aumento da susceptibilidade a acidez gástrica, um ensaio de susceptibilidade a baixo pH foi realizado. Nenhuma diferença significativa foi observada na contagem de UFC entre amostra virulenta e mutantes recuperados do pH 7 e pH 4 após 30 minutos a 37°C. Todas as amostras de *B. melitensis* 16M ou mutantes apresentaram uma

diminuição significativa na contagem de UFC a pH 2 com nenhuma diferença significativa entre as amostras (Figura 9).

Ao mesmo tempo, a susceptibilidade de 16M e amostras mutantes a sais biliares foi verificada usando TSB com 5% ou 10% de bile bovina. Houve um decréscimo de 1,2 log de UFC para 16M e *BMΔpmm* em TSB com 5 e 10% de bile bovina enquanto *BMΔvirB2*, *BMΔureI* apresentou um decréscimo de 1,6 log de UFC. Contudo, não houve diferença estatística entre amostra

virulenta e amostras mutantes (Figura 10). Estes resultados indicam que existe susceptibilidade similar a baixo pH e a sais biliares quando comparada amostra virulenta 16M e as amostras mutantes, suportando a

ideia que a colonização reduzida apresentada pelas amostras mutantes não foi resultante de resistência reduzida ao pH ácido ou a sais biliares durante a passagem no trato digestivo.

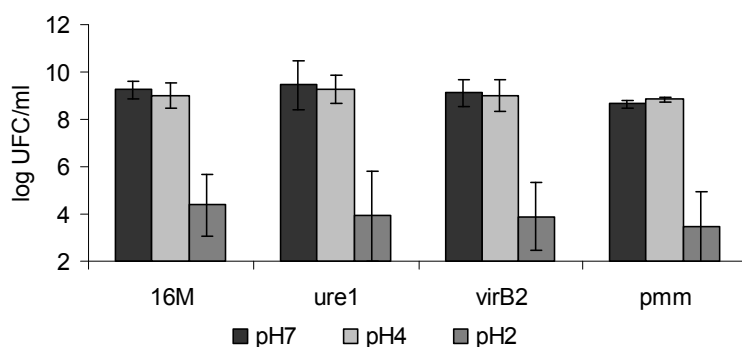


Figura 9. Análise da sobrevivência da *Brucella melitensis* 16M e amostras mutantes a pH 7, 4 e 2 após 30 minutos a 37°C. As soluções contendo bactéria foram diluídas e plaqueadas para contagem de UFC. Os resultados estão representados por média aritmética e desvio padrão de dois experimentos independentes. Não houve diferença entre as amostras avaliadas pelo teste T de Student não pareado ($p > 0,05$).

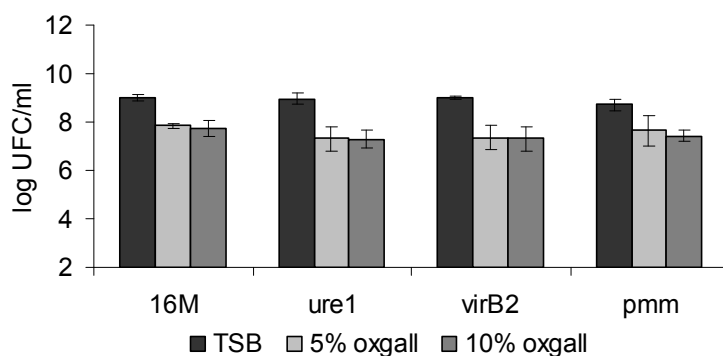


Figura 10. Análise da sobrevivência da *Brucella melitensis* 16M e amostras mutantes a soluções contendo 5 ou 10% de sais biliares (bile bovina) após 18 horas sob agitação a 37°C. As soluções contendo bactéria foram diluídas e plaqueadas para contagem de UFC. Os resultados estão representados por média aritmética e desvio padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença entre as amostras avaliadas pelo teste T de Student não pareado ($p > 0,05$).

Discussão

Relatos prévios indicam que a urease pode ter um papel importante na sobrevivência e invasão através do trato digestivo (Bandara et al., 2007; Sangari et al., 2007), por outro lado, SST4 e LPS têm sido reconhecidos como fatores de virulência importantes para sobrevivência intracelular, contudo o papel deles durante os passos iniciais da infecção pela via oral não é conhecida (Boschioli et al., 2002; Lapaque et al., 2005). Com intuito de investigar o requerimento da urease, SST4 e LPS no estabelecimento da infecção de *B. melitensis* pelo trato digestivo em camundongos, amostra mutantes com deleção de *ureCBA* do operon *ure1*, deleção polar do *virB2*, ou deleção do *pmm* foram construídos.

Os genes que codificam urease parecem ser requeridos para o estabelecimento da infecção por *B. suis* e *B. abortus* por via oral em camundongos (Bandara et al., 2007; Sangari et al., 2007). A urease é uma enzima com várias subunidades, envolvida no metabolismo do nitrogênio, que causa aumento no pH devido à produção de amônia como resultado da hidrólise da uréia (Collins e D'Orazio, 1993). *B. abortus* e *B. suis* possuem dois operons não adjacentes de urease. A *ure1* é responsável pela atividade da urease e a sua inativação causa atenuação em camundongos inoculados via trato digestivo (Sangari et al., 2007, Bandara et al., 2007; Contreras-Rodriguez et al., 2008). A *B. melitensis* possui também dois operons não adjacentes da urease, e usualmente apresenta atividade de urease mais baixa que *B. suis* e *B. abortus*. Apesar de alguns isolados de *B. melitensis* apresentarem atividade de urease semelhante a *B. suis* e *B. abortus* (Corbel e Hendry, 1985; Alton et al., 1988).

Neste estudo, uma amostra mutante de *B. melitensis* com deleção das subunidades $\alpha\beta\gamma$ do operon *ure1* foi gerada para verificar o papel da urease como fator de virulência

durante infecção gastrointestinal. Interessantemente, *BM Δ ure1* é atenuada aos 7 dpi no baço e fígado do camundongo, quais resultados são semelhantes ao estudo prévio com *B. suis* (Bandara et al., 2007). Contudo, o mutante não foi atenuado no linfonodo mesentérico. Por outro lado, *BM Δ ure1* é atenuada no íleo e no linfonodo mesentérico, mas não no baço e fígado durante infecção mista. Estes resultados sugerem que infecções independentes ou mistas podem ter efeitos distintos na atenuação de *BM Δ ure1*, como por exemplo, a infecção pela amostra mutante pode sofrer efeitos compensatórios da co-infecção com amostra virulenta 16M.

É importante ressaltar que o número pequeno de bactéria no baço de camundongos infectados com *BM Δ ure1* não é necessariamente devido à menor habilidade do mutante em sobreviver no trato digestivo e, conseqüentemente, em atingir os sítios sistêmicos. Esta ideia é suportada pelos resultados indicando que *BM Δ ure1* tem um taxa de sobrevivência semelhante à amostra virulenta em pH ácido. Adicionalmente, foi demonstrado que a neutralização do pH gástrico não foi essencial para o estabelecimento da infecção por *B. melitensis* pelo trato digestivo. Estes resultados significam que embora a acidez gástrica afete significativamente a sobrevivência de *B. melitensis* no trato digestivo, ela não impede o estabelecimento da infecção sistêmica.

O SST4 e LPS são dois fatores de virulência importantes da *Brucella*. O SST4 é essencial para a sobrevivência e multiplicação em macrófagos e infecção persistente em camundongos (O'Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000; den Hartigh et al., 2004 e 2008). Já a cadeia O do LPS é incriminada na sobrevivência extracelular e intracelular inicial, inibição da apoptose, modulação da resposta imunológica do hospedeiro (Allen et al., 1998; Porte et al., 2003; Jimenez de

Bagues et al., 2004; Lapaque et al., 2005). Contudo, o requerimento destes fatores de virulência não foi ainda investigado pela via gastrointestinal. Este trabalho demonstrou que *BM Δ virB2*, amostra mutante com SST4 afuncional e *BM Δ pmm*, amostra mutante deficiente de fosfomanomutase, uma enzima importante na formação da cadeia O do LPS, são atenuados em camundongos infectados intragastricamente. Não se pode afirmar que houve deficiência na invasão, visto que não houve diferença na quantidade de bactéria isolada entre *BM Δ virB2* e amostra virulenta 16M a 1 dpi. Uma vez que a diferença foi detectada apenas com 7 dpi, sugere-se que SST4 é requerido para ter intensidade de colonização semelhante a amostra virulenta na infecção via trato digestivo após 7 dpi, semelhante ao que ocorre nas infecções experimentais pela via intraperitoneal em camundongos (Rolán e Tsolis, 2007). Esta atenuação observada na amostra deficiente de SST4 indica que a perda da habilidade em sobreviver intracelularmente independe da via de infecção. Por outro lado, *BM Δ pmm* foi atenuada em camundongos aos 1 e 7 dpi. Uma hipótese para explicar

este fenótipo é que amostras mutantes com LPS rugoso podem ser mais facilmente mortas no ambiente extracelular por complemento e peptídeos antimicrobianos como as defensinas intestinais bem como ter sobrevivência intracelular prejudicada contribuindo para atenuação inicial e tardia em camundongo (Lapaque et al., 2005).

CONCLUSÕES

- Neste estudo foi desenvolvido um modelo animal de brucelose baseado na infecção gastrointestinal que tem grande potencial para contribuir na expansão do conhecimento da patogênese da *B. melitensis*.
- A *Brucella melitensis* não causa inflamação intestinal durante infecção gastrointestinal.
- Urease, SST4 e LPS são fatores de virulência requeridos para infecção de *B. melitensis* via trato digestivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M.R.; CHEVILLE, N.F.; DEYOE, B.L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Pathol.*, v.25, p.28-35, 1988.
- 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. *Brucella melitensis*. In: NIELSEN, K.H.; DUNCAN, J.R. *Animal brucellosis*. Florida: CRC Press, 1990. cap.17, p.383-422.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; et al. *Techniques for Brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988, 190p.
- 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, 1986a.
- ANDERSON, T.D; MEADOR, V.P; CHEVILLE, N.F. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet. Pathol.*, v. 23, p. 227-239, 1986b.
- ARAJ, G.F.; LULU, A.R.; KHATEEB, M.I.; et al. Specific IgE response in patients

- with brucellosis. *Epidemiol. Infect.*, v.105, p.571-577, 1990.
- 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.
- ARENAS, G.N.; STASKEVICH, A.S.; ABALLAY, A.; et al. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, v.68, p.255-263, 2000.
- ARLETT, P.R. A case of laboratory acquired brucellosis. *Br. Med. J.*, v.313, p.1130-1132, 1996.
- 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.
- BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.367-382, 2002.
- BANDARA, A.B.; CONTRERAS, A.; CONTRERAS-RODRIGUEZ, A.; et al. *Brucella suis* urease encoded by ure1 but not ure2 is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol.*, v.7, p.1-14, 2007.
- BARBUDDHE, S.B.; KUMAR, P.; MALIKA, S.V.; et al. Seropositivity for intracellular bacterial infections among abattoir associated personnels. *J. Commun. Dis.*, v.32, p.295-299, 2000.
- BARNES, P.D.; BERGMAN, M.A.; MECSAS, J.; et al. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J. Exp. Med.*, v.203, p.1591-1601, 2006.
- BARQUERO-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 One*, v.2, p.1-14, 2007.
- BARRIONUEVO, P.; CASSATARO, J.; DELPINO, M.V.; et al. *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.*, v.76, p.250-262, 2008.
- BERGUER, P.M.; MUNDIÑANO, J.; PIAZZON, I.; et al. A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR-4. *J. Immunol.*, v.176, p.2366-2372, 2006.
- 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.
- BILLARD, E.; DORNAND, J.; GROSS, A. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infect. Immun.*, v.75, p.5916-23, 2007.
- BIRMINGHAM, J.R.; JESKA, E. Characterization of macrophage functions in mice infected with *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.32, p.1079-83, 1981.
- BOISMENU, R.; HAVRAN, W.L. An innate view of $\gamma\delta$ T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, v.9, p.57-63, 1997.
- BORRIELLO, S.P. Bacteria and gastrointestinal secretion and motility. *Scand. J. Gastroenterol.*, v.93, p.15-21, 1984.

- BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; et al. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.341-348, 2002a
- BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; et al. The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.1544-1549, 2002b.
- BOSSERAY, N. Mother to young transmission of *Brucella abortus* infection in mouse model. *Ann. Rech. Vet.*, v.13, p.341-349, 1982.
- BRIONES, G.; IÑÓN DE IANNINO, N.; ROSET, M.; et al. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.*, v.69, p.4528-4535, 2001.
- BREW, S.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; et al. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet. Rec.*, v.144, p.483, 1999.
- BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.2660-2666, 1994.
- 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.
- CAMPOS, M.A.; ROSINHA, G.M.; ALMEIDA, I.C.; et al. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.*, v.72, p.176-186, 2004.
- 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.13, 2006.
- CARON, E.; PEYRARD, T.; KOHLER, S.; et al. Live *Brucella* spp. fail to induce TNF- α excretion upon infection of U-937-derived phagocytes. *Infect. Immunol.*, v.62, p.5267-5274, 1994.
- CARVALHO NETA, A.V.; STYNEN, A.P.; PAIXÃO, T.A.; et al. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.76, p.1897-1907, 2008.
- CASTAÑEDA-ROLDÁN, E.I.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; SALDAÑA, Z.; et al. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, v.8, p.1877-87, 2006.
- CELLI, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res. Microbiol.*, v.157, p.93-98, 2006.
- 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.
- 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.
- COLLINS, C.M.; D'ORAZIO, S.E. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, v.9, p.907-913, 1993.
- COLMENERO, J.D.; REGUERA, J.M.; MARTOS, F.; et al. Complications associated with *Brucella melitensis*

- infection: a study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)*, v.75, n.4, p.195-211, 1996.
- 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, p.159-168, 2001.
- CONTRERAS-RODRIGUEZ, A.J.; QUIROZ-LIMON, A.M.; MARTINS, H.; et al. Enzymatic, immunological and phylogenetic characterization of *Brucella suis* urease. *BMC Microbiol.*, v.8, p.121, 2008.
- COPIN, R.; DE BAETSELIER, P.; CARLIER, Y.; et al. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J. Immunol.*, v.178, p.5182-5191, 2007.
- 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. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, p.213-221, 1997.
- CORBEL, M.J.; HENDRY, D.M. Urease activity of *Brucella* species. *Res. Vet. Sci.* v.38, p.252-253, 1985.
- DECKER, T.; MÜLLER, M.; STOCKINGER, S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat. Rev. Immunol.*, v.5, p.675-687, 2005.
- 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 macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* v.70, p.1378-1396, 2008.
- DELPINO, M.V.; MARCHESINI, M.I.; ESTEIN, S.M.; et al. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infect. Immun.*, v.75, p.299-305, 2007.
- DELRUE, R.M.; MARTINEZ-LORENZO, M.; LESTRATE, P.; et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell. Microbiol.*, v.3, p.487-497, 2001.
- DELVECCHIO, V.G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R.J.; et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.443-448, 2002.
- DEN HARTIGH, A.B.; ROLÁN, H.G.; DE JONG, M.F.; TSOLIS, R.M. *VirB3* to *VirB6* and *VirB8* to *VirB11*, but not *VirB7*, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J. Bacteriol.*, v.190, p.4427-4436, 2008.
- 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.143-149, 2004.
- DINARELLO, C.A.; FANTUZZI, G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J. Infect. Dis.*, v.87, p.370-384, 2003.
- DORNAND, J.; GROSS, A.; LAFONT, V.; et al. The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.383-394, 2002.
- DORNAND, J.; LAFONT, V.; OLIARO, J. Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism. *Infect. Immun.*, v.72, p.2303-2311, 2004.

- DUDAL, S.; TURRIERE, C.; BESSOLES, S.; et al. Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*. *J. Immunol.*, v.177, p.5533-5539, 2006.
- DUEÑAS, A.I.; ORDUÑA, A.; CRESPO, M.S.; et al. Interaction of endotoxins with Toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella* spp. LPS. *Int. Immunol.* v.16, p.1467-1475, 2004.
- EISENSCHENK, F.C.; HOULE, J.J.; HOFFMANN, E.M. Serum sensitivity of field isolates and laboratory strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* v.56, p.1592-1598, 1995.
- 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.
- ENRIGHT, F.M.; ARAYA, L.N.; ELZER, P.H. Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.26, p.171-182, 1990.
- ESKRA, L.; MATHISON, A.; SPLITTER, G. Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.71, p.1125-1133, 2003.
- FERNANDES, D.M.; BALDWIN, C.L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.63, p.1130-1133, 1995.
- 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.
- FERNANDES, D.M.; JIANG, X.; JUNG, J.H. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.16, p.193-203, 1996.
- FERNÁNDEZ-LAGO, L.; ORDUÑA, A.; VIZCAÍNO, N. Reduced interleukin-18 secretion in *Brucella abortus* 2308-infected murine peritoneal macrophages and in spleen cells obtained from *B. abortus* 2308-infected mice. *J. Med. Microbiol.*, v.54, p.527-531, 2005.
- FERNANDEZ-LAGO, L.; MONTE, M.; CHORDI, A. Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.15, p.109-114, 1996.
- 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.
- FICHT, T.A. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.213-223, 2003.
- FORESTIER, C.; DELEUIL, F.; LAPAQUE, N.; et al.; *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J. Immunol.*, v.165, p.5202-5210, 2000.
- FUKATA, M.; ABREU, M.T. TLR-4 signalling in the intestine in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.*, v.35, p.1473-1478, 2007.
- GARCIA-PENARRUBIA, P.; FOSTER, F.T.; KELLEY, R.O.; et al. Antibacterial

- activity of natural killer cells. *J. Exp. Med.*, v.169, p.99-113, 1989.
- GARCIA-CARRILO, C. Laboratory animal model for Brucellosis studies. In: NIELSEN, K.H.; DUNCAN, J.R. *Animal brucellosis*. Florida: CRC Press, 1990, cap. 19, p.422-423.
- GIAMBARTOLOMEI, G.H.; ZWERDLING, A.; CASSATARO, J. et al. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J. Immunol.*, v.173, p.4635-4642, 2004.
- 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.
- GODFROID, J.; KÄSBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.135-145, 2002.
- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.281-297, 2002.
- GROSS, A.; BERTHOLET, S.; MAUEL, J., et al. Impairment of *Brucella* growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide. *Microb. Pathog.*, v.36, p.75-82, 2004.
- GROSS, A.; SPIESSER, S.; TERRAZA, A.; et al. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.66, p.1309-1316, 1998.
- GROSS, A.; TERRAZA, A.; OUAHRANI-BETTACHE, S. et al. *In vitro Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect. Immun.*, v.68, p.342-351, 2000.
- GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; VON EICHEL-STREIBER, C.; et al. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non professional phagocytes: direct activation of CDC42. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.44435-44443, 2001.
- HALLING, S.M.; PETERSON-BURCH, B.D.; BRICKER, B.J.; et al. Completions of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, v.187, p. 2715-2726, 2005.
- HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Ir. Vet. J.*, v.50, p.179-180, 1997.
- HO, M.; CHEERS, C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. *J. Infect. Dis.*, p.146, p.381-7, 1982.
- 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.
- HUANG, L.Y.; ALIBERTI, J.; LEIFER, C.A.; et al. Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. *J. Immunol.*, v.171, p.1441-1446, 2003.
- HUANG, L.Y.; ISHII, K.J.; AKIRA, S.; et al. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *J. Immunol.*, v.175, p.3964-3970, 2005.

- IZADJOO, M.J.; MENSE, M.G.; BHATTACHARJEE, A.K.; et al. A study on the use of male animal models for developing a live vaccine for brucellosis. *Transbound. Emerg. Dis.*, v.55, p.145-151, 2008.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; et al. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5ed., New York: Garland publishing, 2001, 767p.
- 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.
- JIANG, X.; LEONARD, B.; BENSON, R.; et al. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell. Immunol.*, v.151, p.309-319, 1993.
- JIMÉNEZ 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.*, p.72, v.2429-2433, 2004.
- JONES, S.M.; WINTER, A.J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v.60, p.3011-3014, 1992.
- JORENS, P.G.; MICHELSEN, P.P.; VAN DEN ENDEN, E.J.; et al. A rare cause of colitis-*Brucella melitensis*. Report of a case. *Dis. Colon Rectum*, v.34, p.194-196, 1991.
- KAHL-MCDONAGH, M.M.; ARENAS-GAMBOA, A.M.; FICHT, T.A. Aerosol Infection of BALB/c mice with *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* and protective efficacy against aerosol challenge *Infect. Immun.*, v.75, p.4923-4932, 2007.
- KIM, S.; LEE, D.S.; WATANABE, K.; et al. Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol.*, v.5, p.22, 2005.
- KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, p.65-78, 2003.
- KÖHLER S, PORTE, F.; JUBIER-MAURIN, V.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; et al. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.299-309, 2002.
- LAFONT, F.; VAN DER GOOT, F.G. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell. Microbiol.*, v.7, p.613-620, 2005.
- LAI, F.; SCHURIG, G.G.; BOYLE, S.M. Electroporation of a suicide plasmid bearing a transposon into *Brucella abortus*. *Microb. Pathog.*, v.9, p.363-368, 1990.
- LAPAQUE, N.; FORQUET, F.; DE CHASTELLIER, C.; et al. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. *Cell. Microbiol.*, v.8, p.197-206, 2006.
- LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, p.60-66, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods*, v.25, p.402-408, 2001.
- LOISEL-MEYER, S.; JIMENEZ DE BAGUES, M.P.; BASSERES, E.; et al.

- Requirement of *norD* for *Brucella suis* virulence in a murine model of in vitro and in vivo infection. *Infect. Immun.*, v.4., p.1973–1976, 2006.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; et al. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.329-339, 2002.
- MACEDO, G.C.; MAGNANI, D.M.; CARVALHO, N.B.; et al. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J. Immunol.*, v.180, p.1080-1087, 2008.
- MAGALHÃES, J.G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S.E. Intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars Immunol.*, v.19, p.106-115, 2007.
- MAHAJAN, N.K.; KULSHRESTHA, R.C.; VASUDEVAN, B. Brucellosis - cause of abortion in sheep and its public health significance. *Int. J. Zoonoses*, v.13, p.174-179, 1986.
- MANTUR, B.G.; AMARNATH, S.K.; SHINDE, R.S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J. Med. Microbiol.*, v.25, p.188-202, 2007.
- MARTÍNEZ DE TEJADA, G.; PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; et al. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.*, v.63, p.3054-3061, 1995.
- MAZOKOPAKIS, E.E.; GIANNAKOPOULOS, T.G.; CHRISTIAS, E.G. Acute brucellosis as a cause of infective colitis. *Mil. Med.*, v.173, p.1145-1147, 2008.
- MCDONALD, W.L.; JAMALUDIN, R.; MACKERETH, G.; et al. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, p.4363-4370, 2006.
- MEADOR, V.P.; TABATABAI, 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.
- MENSE, M.G.; VAN DE VERG, L.L.; BHATTACHARJEE, A.K.; et al. Bacteriologic and histologic features in mice after intranasal inoculation of *Brucella melitensis*. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.398–405, 2001.
- MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; REGUERA, J.M.; et al. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.3743-3746, 2001.
- MORENO, E.; BERMAN, D.T.; BOETTCHER, L.A. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, v.31, p.362-370, 1981.
- MORENO, E.; MORIYON, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.1-3, 2002.
- MURPHY, E.A.; PARENT, M.; SATHIYASEELAN, J.; et al. Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in Balb/c mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.32, p.85-88, 2001.
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.5-9, 2002.

- NIELSEN, K.H.; DUNCAN, J.R. *Animal brucellosis*, Florida: CRC Press, 1990, p.453.
- 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.
- OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Caprine and Ovine Brucellosis (except brucella ovis). 2004. Disponível em: <http://www.oie.int/fr/normes/mmanual> Acesso em 13/03/2009
- OIE, Animal Health information: disease distribution maps from 2007-2008. 2009 Disponível em: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_map Acesso em 13/03/2009.
- OLIARO J, DUDAL S, LIAUTARD J, ANDRAULT JB, LIAUTARD JP, LAFONT V. $\gamma\delta$ 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.; 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. *Microbes Infect.*, v.10, p.1005-1009, 2008.
- OLSEN, S.C.; WATERS, W.R.; STOFFREGEN, W.S. An Aerosolized *Brucella* spp. Challenge Model for Laboratory Animals. *Zoonoses Public Health*, v.54, p.281-285, 2007.
- OTTONES, F.; LIAUTARD, J.; GROSS, A.; et al. Activation of human $\gamma\delta$ T cells by a *Brucella suis* non-peptidic fraction impairs bacterial intracellular multiplication in monocytic infected cells. *Immunology*, v.100, p.252-258, 2000a.
- OTTONES, F.; DORNAND, J.; NAROENI, A.; et al. $\gamma\delta$ T cells impair intracellular multiplication of *Brucella suis* in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect. *J. Immunol.*, v.165 p.7133-7139, 2000b.
- PAPPAS, G.; PANAGOPOULOU, P.; CHRISTOU, L.; et al. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.63, p.2229-2236, 2006a.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. AKRITIDIS, N. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, v.6, p.538-540, 2006b.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.1, p.29-31, 2007.
- PASQUALI, P.; ADONE, R.; GASBARRE, L.C.; et al. Cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect. Immun.*, v.69, p.6541-6544, 2001.
- PASQUALI, P.; ROSANNA, A.; PISTOIA, C.; et al. *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain *B. abortus* 2308. *Infect. Immun.*, v.71, p.2326-2330, 2003.
- PAULSEN, I. T.; SESHADRI, R.; NELSON, K. E.; et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.13148-13153, 2002.
- PEI, J.; FICHT, T.A. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infect. Immun.*, v.72, p.440-450, 2004.

- PEI, J.; TURSE, J.E.; FICHT, T.A. Evidence of *Brucella abortus* OPS dictating uptake and restricting NF-kappaB activation in murine macrophages. *Microbes Infect.*, v.10, p.582-590, 2008.
- PEI, J.; TURSE, J.E.; WU, Q.; et al. *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. *Infect. Immun.*, v.74, p.2667-2675, 2006.
- PETRELLA, R.; YOUNG, E.J. Acute brucella ileitis. *Am. J. Gastroenterol.*, v.83, p.80-82, 1988.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MÉRESSE, S.; PARTON, R.G.; et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.*, v.66, p. 5711-5724, 1998^a.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; et al. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.*, v.66, p.2387-2392, 1998b.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.55-62, 2002.
- PORTE, F.; LIAUTARD, J.P.; KÖHLER, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.67, p.4041-4047, 1999.
- PORTE, F.; NAROENI, A.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.71, p.1481-1490, 2003.
- POTASMAN, I.; EVEN, L. BANAI, M.; et al. Brucellosis: an unusual diagnosis for a seronegative patient with abscesses, osteomyelitis, and ulcerative colitis. *Rev. Infect. Dis.*, v.13, p.1039-1042, 1991.
- QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; MORATA, P.; OCÓN, P.; et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.2927-2930, 1997.
- RAFIEI, A.; ARDESTANI, S.K.; KARIMINIA, A.; et al. Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease. *J. Infect.*, v.53, p.315-324, 2006.
- RAMBOW-LARSEN, A.A., RAJASHEKARA, G.; PETERSEN, E.; et al. Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J. Bacteriol.*, v.190, p.3274-3282, 2008.
- 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.
- RILEY, L.K.; ROBERTSON, D.C. Brucellacidal activity of human and bovine polymorphonuclear leukocyte granule extracts against smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.46, p.231-236, 1984.
- RILEY, L.K.; ROBERTSON, D.C. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in Human. *Infect. Immun.*, v.46, p.224-230, 1984.
- ROLÁN, 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.

- ROLÁN, 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.*, no prelo.
- 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.
- SALMERON, I.; RODRIGUEZ-ZAPATA, M.; SALMERON, O.; et al. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.15, p.764-770, 1992.
- SANGARI, F.J.; SEOANE, A.; RODRÍGUEZ, M.C. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect. Immun.*, v.75, p.774-780, 2007.
- SANTOS, R.L.; SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; et al. Brucelose: Zoonose e Bioterrorismo. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.83-98, 2005.
- SATHIYASEELAN, J.; JIANG, X.; BALDWIN, C.L. Growth of *Brucella abortus* in macrophages from resistant and susceptible mouse strains. *Clin. Exp. Immunol.*, v.121, p.289-294, 2000.
- SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E.; WHATMORE, A.M.; QUANCE, C.R.; et al. A novel *Brucella* isolate 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.
- SIEIRA, R.; COMERCI, D.J.; SANCHEZ, D. O.; et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.*, v.182, p.849-855, 2000.
- SILVA, F. L., PAIXÃO, T.A. SANTOS, R.L. Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, v.47, p.1-12, 2005.
- SOHN, A.H.; PROBERT, W.S.; GLASER, C.A.; et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, p.485-488, 2003.
- SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GRILLÓ, 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, p.125-138, 1998.
- STERMER, E.; LEVY, N. POTASMAN, I.; et al. Brucellosis as a cause of severe colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, v.86, p.917-919, 1991.
- STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; PUGH JR., et al. Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect. Immun.*, v.62, p.3206-3212, 1994.

- SUN, Y.H.; DEN HARTIGH, A.B.; SANTOS, R.L.; et al. *virB*-Mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages. *Infect. Immun.*, v.70, p.4826-4832, 2002.
- SVETIC, A.; JIAN, Y.C.; FINKLEMAN, F.D.; et al. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN- γ in CD41 T cells. *Int. Immunol.*, v.5, p.877-883, 1993.
- TOBIAS, L.; CORDES, D.O.; SCHURIG, G.G. Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. *Vet. Pathol.*, v.30, p.119-129, 1993.
- TUMURKHUU, G.; KOIDE, N.; TAKAHASHI, K.; et al. Characterization of biological activities of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide. *Microbiol. Immunol.*, v.50, p.421-427, 2006.
- UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.*, v.84, p.712-725, 2006.
- VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.; et al. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v.138, p.235-238, 1987.
- WANG, M.; QURESHI, N.; SOEURT, N.; et al. High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. *Microb. Pathog.*, v.31, p.221-230, 2001.
- WEISS, D.S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; et al. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.73, p.5137-5143, 2005.
- 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.
- YAGUPSKY, P. Detection of *Brucella* in Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.3437-3442, 1999.
- YAGUPSKY, P.; PELED, N.; PRESS, J. Use of BACTEC 9240 Blood Culture System for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.738-739, 2001.
- ZHAN, Y.; CHEERS, C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.61, p.4899-4901, 1993.
- ZHAN, Y.; CHEERS, C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.63, p.1387-1390, 1995.
- ZHAN, Y.; LIU, Z.; CHEERS, C. Tumor necrosis 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.

ANEXOS

1. Resultados de contagem bacteriana (log de UFC) durante a cinética de infecção.

Dias após infecção						
íleo	0,3	1	3	7	14	21
χ	3,311	2,547	1,217	2,711	1,721	1,548
dp	2,064	0,535	1,726	1,3	1,195	0,921
ep	0,923	0,169	0,772	0,411	0,534	0,412
ceco	0,3	1	3	7	14	21
χ	4,857	4,086	2,655	2,118	2,065	0,993
dp	0	0,531	0,488	0,816	0,51	1,094
ep	0,007	0,237	0,218	0,365	0,228	0,489
cólon	0,3	1	3	7	14	21
χ	5,676	3,734	3,231	2,513	0,982	1,13
dp	0,134	1,419	0,759	1,345	0,909	1,055
ep	0,06	0,449	0,339	0,425	0,408	0,471
PP	0,3	1	3	7	14	21
χ	0,241	0,101	0,296	1,383	1,507	0,217
dp	0,515	0,496	0,331	1,03	0,454	0,738
ep	0,23	0,157	0,148	0,326	0,203	0,33
LM	0,3	1	3	7	14	21
χ	0,483	0,57	1,297	2,725	3,159	3,456
dp	0,595	0,562	0,851	0,607	0,88	0,318
ep	0,266	0,187	0,381	0,192	0,394	0,142
Baço	0,3	1	3	7	14	21
χ	1,81	1,85	2,20	4,03	4,42	3,75
dp	1,807	1,319	2,215	1,54	1,726	2,366
ep	0,808	0,417	0,991	0,487	0,772	1,058
Fígado	0,3	1	3	7	14	21
χ	0,464	0,545	2,007	2,9	2,112	1,857
dp	1,038	0,598	1,025	1,207	1,326	1,518
ep	0,464	0,189	0,458	0,382	0,593	0,679

animais n=5 n=10 n=5 n=10 n=5 n=5

χ = média

dp = desvio padrão

ep = erro padrão

PP = Placas de Peyer. LM = Linfonodo mesentérico.

2. Resultados de RT-PCR quantitativa (valores médios do log de variação de expressão de RNAm em comparação ao controle).

Baço n=5				Íleo n=5					
	IFNγ	TNFα	iNOS	IL-6	KC	MIP2	MIP3α	iNOS	
7 dpi	1,67	1,72	0,52	1 dpi	1,254	1,509	4,698	2,553	2,919
14 dpi	4,7	2,3	2,894	3 dpi	1,241	1,485	4,282	5,089	6,091
21 dpi	3,27	2,17	12,92	7 dpi	0,751	0,669	2,278	3,774	0,744
dp+	0,33	0,18	2,417	dp+	0,073	0,336	1,85	2,277	0,529
	1,72	0,84	17,46		0,708	0,355	1,122	1,221	1,457
	1,34	0,11	34,21		0,233	0,256	0,712	1,88	18,55
dp-	0,2	0,13	0,154	dp-	0,062	0,197	0,824	0,596	0,336
	0,8	0,39	0,869		0,252	0,202	0,614	0,694	0,83
	0,58	0,1	3,651		0,118	0,116	0,358	0,73	0,232

dp+ = desvio padrão positivo

dp- = desvio padrão negativo

IFN γ = Interferon gama

TNF α = Fator de necrose tumoral alfa

IL-6 = Interleucina-6

KC = Quimiocinas de Neutrófilos

MIP2 = Proteína Inflamatória de Macrófagos 2

MIP3 α = Proteína Inflamatória de Macrófagos 3 alfa

iNOS = Oxido Nítico Sintetase indutível

3. Resultados da contagem bacteriana (log de UFC) da infecção com 16M ou amostras mutantes.

1 dia após infecção

	n=10	n=5	n=5	n=5
íleo	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	2,547	2,211	1,095	0,955
dp	0,504	2,124	1,500	1,409

ML	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	0,570	0,476	0,095	0
dp	0,562	0,538	0,213	0

baço	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	1,852	1,199	1,307	0,389
dp	1,319	1,673	1,794	0,869

figado	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	0,545	0,174	0	0,286
dp	0,532	0,389	0	0,639

χ = média

dp = desvio padrão

ML = Linfonodo Mesentérico

7 dias após infecção

	n=10	n=5	n=5	n=5
íleo	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	2,711	1,599	0	0,5046
dp	1,856	1,730	0	1,1283

LM	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	2,7245	2,4363	0,0602	0
dp	0,6067	0,2861	0,1346	0

baço	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	4,028	0,739	0,781	0,900
dp	1,540	1,652	1,746	2,012

figado	16M	Urease	VirB2	pmm
χ	2,900	0,415	0	0,171
dp	1,207	0,927	0	0,383

χ = média

dp = desvio padrão

ML = Linfonodo Mesentérico

4. Resultados da contagem bacteriana (log de UFC) da infecção mista com 16M e amostras mutantes.

		n=5		n=5		n=5	
		16M	virB2	16M	pmm	16M	ure1
Baço	1 dia	3,410	2,594	4,135	2,212	2,872	2,177
	7 dias	3,509	2,031	4,970	2,606	2,343	1,723
figado	1 dia	1,595	1,307	2,424	1,209	1,221	0,986
	7 dias	2,072	1,248	2,654	1,237	1,360	0,965
íleo	1 dia	3,683	2,954	4,045	2,707	4,856	2,909
	7 dias	3,784	2,371	4,795	2,380	3,200	2,531
LM	1 dia	2,352	1,563	1,856	1,662	1,990	1,499
	7 dias	3,800	1,000	3,844	1,769	2,832	1,248
	dp	0,209	0,121	0,417	0,101	0,177	0,128
		0,409	0,022	0,113	0,384	0,282	0,015
		0,151	0,055	0,263	0,014	0,105	0,026
		0,230	0,020	0,354	0,045	0,235	0,026
		0,145	0,176	0,355	0,125	0,304	0,177
		0,140	0,136	0,114	0,128	0,220	0,249
		0,143	0,244	0,118	0,111	0,178	0,189
		0,162	0,000	0,402	0,299	0,395	0,388

dp = desvio padrão

LM = Linfonodo mesentérico

5. Resultados da contagem bacteriana (log de UFC) dos ensaios de resistência

Resistência a pH baixo

	pH7	pH4	pH2
16M	9,249	9,015	4,389
Urease	9,438	9,250	3,902
virB2	9,118	9,000	3,889
pmm	8,640	8,852	3,443
dp	0,367	0,547	1,290
	1,044	0,594	1,878
	0,562	0,690	1,414
	0,182	0,094	1,478
Média de 2 experimentos			

Resistência a sais biliares

	TSA	5% oxgall	10% oxgall
16M	9,0020	7,8366	7,7370
Urease	8,9621	7,3032	7,2858
virB2	8,9840	7,3515	7,3047
pmm	8,7233	7,6430	7,4293
dp	0,2294	0,4713	0,3716
	0,0835	0,4868	0,5179
	0,2273	0,6461	0,2410
	0,1552	0,5399	0,9374
Média de 3 experimentos			

dp = desvio padrão