

Juliana Pinto da Silva Mol

**RESPOSTA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS BOVINAS À INFECÇÃO POR
Brucella abortus: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage

Coorientadores: Prof. Héli da Monteiro de Andrade
Prof. Renato de Lima Santos
Dr^a. Ana Paula Reinato Stynen

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2012

M717r

Mol, Juliana Pinto da Silva, 1977-

Resposta de células trofoblásticas bovinas à infecção por *Brucella abortus*: uma abordagem proteômica / Juliana Pinto da Silva Mol – 2012.

126 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage

Co-orientadores: Héliida Monteiro de Andrade, Renato de Lima Santos, Ana Paula Reinato Stynen

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia


1. Bovino – Doenças – Teses. 2. *Brucella abortus* – Teses. 3. Brucelose em bovino – Teses. 4. Bovino – Infecção – Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Andrade, Héliida Monteiro de. III. Santos, Renato de Lima. IV. Stynen, Ana Paula Reinato. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. VI. Título.

CDD – 636.208 969 57

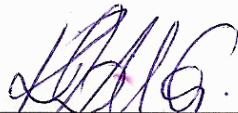
Tese defendida e aprovada em 02 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Andrey Pereira Lage
Presidente



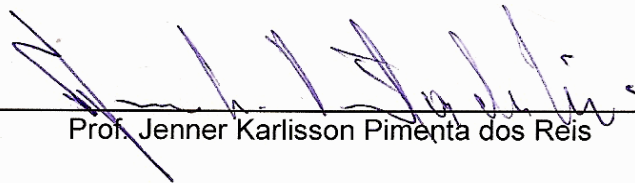
Profª. Patrícia Cuervo Escobar



Profª. Karina Leite Miranda Guimarães



Profª. Zélia Inês Portela Lobato



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Ao meu amado pai, que tão cedo nos deixou...

Instrutores educam.
Amigos amparam.
Companheiros alentam.
Relações ajudam.
Preces iluminam.
Lições preparam.
Dificuldades adestram.
Provas definem.
Dores corrigem.
Lutas renovam.
Problemas propõem.
Soluções indicam.
Atitudes revelam.
Lágrimas purificam.
Experiências marcam.

Do livro Palavras de Vida Eterna
Francisco Cândido Xavier – Pelo Espírito de Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram na realização deste trabalho. Em particular agradeço:

- A Deus;
- Ao meu pai Edson, meu maior orientador, dedico este trabalho. Muito obrigada pelo incentivo e por me ensinar o valor do trabalho com amor, independente das dificuldades. A minha mãe Rita, exemplo de força e dedicação, às minhas irmãs Aline e Giselle e aos meus lindos sobrinhos Bernardo e Gustavo, pela por trazerem tanta alegria à nossa família. Ao Wellison, meu amor, meu amigo e companheiro. Muito obrigada pelo apoio incondicional;
- Ao prof. Andrey Pereira Lage, pela oportunidade de trabalho e de aprendizado;
- Aos alunos do Laboratório de Bacteriologia Aplicada: Giovanna, Ana Paula, Elaine, Jordana, Danilo e Ana Raquel pela amizade e pelos momentos de trabalho e alegria compartilhados;
- Aos ex-alunos do Laboratório de Bacteriologia Aplicada Sílvia, Telma, Rebeca, Monalisa pela amizade e carinho de sempre;
- À prof. Héliida Monteiro de Andrade, pela colaboração em todas as fases desse trabalho e principalmente, por ter me recebido em seu laboratório de forma tão generosa;
- À Simone da Fonseca Pires, aluna de Pós-doutorado do Laboratório de Leishmanioses - Departamento de Parasitologia/ICB – UFMG. Muito obrigada pela imensa contribuição na realização desse trabalho.
- Aos funcionários e alunos do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia/ICB-UFMG;
- Ao prof. Marcos Bryan Heinemann pelo apoio e presença constantes durante todo o trabalho;
- Ao prof. Renato de Lima Santos e aos alunos do Laboratório de Patologia Molecular, em especial, à Érica de Azevedo Costa pela amizade e ajuda nas fases iniciais desse trabalho.
- Ao Dr. Jonas Enrique Perales Aguilar e Dr. Alexander Chapeaurouge do Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro pelas análises de espectrometria de massa;
- Ao Frigorífico Hipercarnes e seus funcionários por nos receberem para coleta do material. Agradeço em especial ao Sr. William e Sr. Antônio Jorge.
- A todos os funcionários e professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva;
- Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e FEP-MVZ.

SUMÁRIO

RESUMO	19
ABSTRACT	19
1 - INTRODUÇÃO.....	20
2 - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	21
2.1 - HISTÓRICO E TAXONOMIA	21
2.2 - CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO	23
2.3 - CLASSIFICAÇÃO	24
2.4 - BRUCELOSE BOVINA	24
2.5 - DIAGNÓSTICO.....	26
2.6 - FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>Brucella</i> spp.	27
2.7 - TRÁFEGO INTRACELULAR	29
2.8 - INFECÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS.....	31
2.9 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR <i>Brucella abortus</i>	32
2.10 - ESTUDOS PROTEÔMICOS	35
2.11 - ANÁLISE PROTEÔMICA E INFECÇÃO POR <i>Brucella</i> spp.	37
3 - HIPÓTESE.....	40
4 - OBJETIVOS.....	40
4.1 - Objetivo Geral	40
4.2 - Objetivos específicos	40
5 - MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1 - Cultivo da amostra de <i>Brucella abortus</i> 2308 para obtenção de proteína total bacteriana	40
5.2 - Extração de proteínas totais de <i>Brucella abortus</i> 2308.....	40
5.3 - Cultivo da amostra de <i>Brucella abortus</i> 2308 e preparo do inóculo para infecção em células trofoblásticas.....	41
5.4 - Confeção de explantes de placenta de bovinos - Coleta da membrana cório-alantóidea de bovinos e confeção dos explantes	41
5.5 - Inoculação dos explantes.....	43
5.6 - Bacteriologia.....	43
5.7 - Extração de proteínas do epitélio trofoblástico dos explantes de membrana cório-alantóidea de bovinos	43
5.8 - Dosagem de proteínas	44
5.9 - Análise Proteômica	44

5.9.1 - Eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE).....	44
5.9.2 - Gel bidimensional (2DE).....	44
5.9.2.1 - Focalização isoeétrica (primeira dimensão)	44
5.9.2.2 - SDS - PAGE (segunda dimensão).....	45
5.9.3 - Análise das imagens dos géis	45
5.9.4 - Eletroforese diferencial em gel (DIGE - <i>Difference Gel Electrophoresis</i>).....	48
5.9.5 - Análise dos géis fluorescentes	48
5.9.6 - Proteólise in gel e preparação das amostras para espectrometria de massa (MS).....	49
5.9.7 - Análise de Espectrometria de Massa (MS).....	50
5.9.8 - Identificação das proteínas em banco de dados	50
5.9.9 - Estudo da predição de interação entre as proteínas identificadas	50
6.1 - Bacteriologia.....	51
6.2 - Obtenção das amostras de proteínas e gel SDS/PAGE	52
6.3 - Determinação do perfil proteico de <i>Brucella abortus</i> 2308 (cultivo por 15 ou por 24 h) para ser usado na análise diferencial.....	52
6.4 - Obtenção do perfil de expressão de proteínas de células trofoblásticas bovinas não infectadas e infectadas por <i>Brucella abortus</i> 2308 e análise de reprodutibilidade entre os géis	55
6.5 - Determinação pelo estudo da cinética da infecção de células trofoblásticas por <i>Brucella abortus</i> 2308 do tempo a ser usado na análise diferencial usando géis DIGE.	59
6.6 - DIGE - <i>Difference Gel Electrophoresis</i>	61
6.7 - Identificação dos spots por Espectrometria de Massa.....	71
6.8 - Estudo da predição de interação entre as proteínas identificadas	78
7 - DISCUSSÃO.....	81
8 - CONCLUSÕES.....	91
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

2DE - eletroforese bidimensional
AAT - Antígeno Acidificado Tamponado
ABHD14B - abhydrolase domain-containing protein 14B
ACTB - *beta actin*
ACTN4 - *alpha-actinin-4*
Ado - adenosina
AdoHcy - *S-Adenosyl-L-homocysteine*
AdoMet - S-adenosil-L-metionina
AFP - *alpha-feto protein precursor*
AHCY - *adenosylhomocysteinase*
AHS1 - *activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1*
AKAP A - *Kinase anchoring proteins*
AKR1B1 - *aldose reductase*
ALB - *Albumin protein*
ATP - *Adenosine-5'-triphosphate*
BLVRA - *biliverdin reductase A*
BOLA2 - *similar to Bola-like protein 2 isoform 1*
BPNT1 - *3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1*
Btp1 - *Brucella Tir-Protein 1*
BVA - *Biological Variation Analysis*
C1QBP - *complement component 1 Q subcomponent-binding protein*
CALM - *calmodulin*
CALR - *calreticulin*
CAPZB - *F-actin-capping protein subunit beta*
CβG - beta-glucano cíclico periplasmático
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal
CKB - *creatine kinase B-type*
CO₂ - Dióxido de carbono
CTSD - *cathepsin D*
CXCL6 (GCP-2) - *Granulocyte chemotactic protein-2*
CXCL-8 (IL-8) - interleucina 8
Cy - cianina
Da - Daltons
DIA - *Differential In-gel Analysis*
DIGE - *Diferencial Gel Electrophoresis*
DNA - *deoxirribonucleic acid*
DnaK - *Chaperone protein dnaK*
DR - Ordem de magnitude
DYNLRB1 - *dynein light chain roadblock-type 1*
EDA - *Extended Data Analysis*
EEA-1 - *early endosomal antigen 1*
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ESI - *Electrospray ionization*
FunCat - *Functional Classification of Proteins*
GALM - *aldose 1-epimerase*
GDF5 - *Growth/differentiation factor 5*
GSNA - *gelsolin isoform a*

GSNB - *gelsolin isoform b*
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
H₂S - Sulfeto de Hidrogênio
HBB - *hemoglobin subunit beta*
Hcy - homocisteína
HEXB - *beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein*
HIBADH - *3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase*
HKBA - *heat killed Brucella abortus*
HMGB-1 - *high mobility group box protein 1*
HSC70 - *heat shock cognate 71 kDa protein*
Hsp - *Heat shock protein*
HSP90B1 - *endoplasmic precursor*
HSPB1 - *heat shock protein beta-1*
iCAT - *Isotope-coded affinity tags*
IEF- Isoeletofocalização
IFN-β - Interferon beta
IFN-γ - Interferon gamma
IgA - Imunoglobulina A
IgG1 - Imunoglobulina G1
IgG2 - Imunoglobulina G2
IgM - Imunoglobulina M
IL-12 - Interleucina 12
IL-1R - *Interleukin-1 receptor*
IL-6 - Interleucina 6
IPG - gradiente de pH imobilizado
IRAK-1 - *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*
IRF3 - *interferon regulatory transcription factor 3*
IRG - *immunity-related GTPases* ou p47 GTPases
ISYNA1 - *inositol-3-phosphate synthase 1*
iTRAQ I - *sobaric tags for relative and absolute quantitation*
JNK - *c-Jun N-terminal Kinase*
kDa - kilodaltons
KRT14 - *keratin, type II cytoskeletal 7*
KRT7 - *keratin 14-like*
KRT8 - *cytokeratin 8*
LAMP-1 - *Lysosomal-associated membrane protein 1*
LGALS7 - *galectin-7-like*
LPS - lipopolissacarídeos
MAL - *MyD88 adapter-like/TIRAP TIR containing adapter protein*
MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPK - *Mitogen-activated protein*
MDH1 - *malate dehydrogenase*
MDP - muramildipeptídeo
MESDC2 - *LDLR chaperone MESD*
MHC - Complexo maior de histocompatibilidade
MLVA - *Multiple Loci VNTR Analysis*
MM - massa molecular
MPT - modificações pós-traducionais

MS - *Mass spectrometry*
 MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*
 NCBI - *National Center of Biotechnology Information*
 NDUFS8 - *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8*
 NF- κ B - *Nuclear factor- κ B*
 NK - *natural killer cells*
 NOD - *nucleotide-binding oligomerization domain*
 OAT - *ornithine aminotransferase*
 PAMP - *Pathogen-associated molecular patterns*
 PBS - *Phosphate buffered saline*
 PCR - *polymerase chain reaction*
 PDI - *protein disulfide isomerase*
 PDIA3 - *protein disulfide-isomerase A3 precursor*
 PGE₂ - *Prostaglandin E2*
 pI - *ponto isoelétrico*
 PNCEBT - *Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose*
 PRCII - *placental prolactin related protein 2 precursor*
 PRDX3 - *thioredoxin-dependent peroxide reductase*
 PSAP - *prosaposin*
 PSAPL1 - *proactivator polypeptide*
 PTGR2 - *prostaglandin reductase 2*
 QS - *Quorum Sensing*
 RAB11A - *ras-related protein Rab-11A*
 Rab5 - *small GTP-binding 5*
 Rab7 - *small GTP-binding 7*
 RE - *retículo endoplasmático*
 RER - *retículo endoplasmático rugoso*
 RNA - *Ribonucleic acid*
 RNI - *reativos intermediários nitrogênio*
 ROI - *reativos intermediários de oxigênio*
 ROS - *espécies de oxigênio reativo*
 RPLP1 - *ribosomal protein P1-like isoform 1*
 S19 - *Strain 19*
 SCAMP2 - *secretory carrier-associated membrane protein 2*
 SDS/PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate/PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
 SERPINB5 - *serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5*
 SFB - *Soro fetal bovino*
 SOD - *superóxido dismutase*
 SST4 - *sistema de secreção do tipo IV*
 TAF-1 - *Transcription initiation factor TFIID subunit 1*
 TAGLN - *transgelin-2*
 tcp - *Genes encoding domain containing-proteins*
 TIR - *Toll-interleukin 1 receptor*
 TIRAP - *Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*
 TLR - *Toll-like receptors*
 TNF- α - *Tumor necrosis factor-alpha*
 TOLLIP - *toll-interacting protein*
 TPM4 - *tropomyosin 4 isoform 2*
 TRAM (TRIF-related adaptor molecule)/TICAM2 (TIR-containing Adaptor Molecule)

TRIF - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
TTR - *transthyretin precursor*
VCB - *vacúolo contendo Brucella*
VCP - *transitional endoplasmic reticulum ATPase*
VNTR - *Variable Number of Tandem Repeat*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de <i>spots</i> detectados nas triplicatas dos géis bidimensionais de <i>Brucella abortus</i> cultivada por 15 h e 24 h.	54
Tabela 2. Número de <i>spots</i> comuns (<i>Match</i>) detectados nas triplicatas dos géis bidimensionais de <i>B. abortus</i>	54
Tabela 3. Número de <i>spots</i> detectados e número/porcentagem de <i>spots</i> comuns (<i>Match</i>) entre as triplicatas dos géis bidimensionais de células trofoblásticas bovinas não infectadas e infectadas por <i>Brucella. abortus</i>	55
Tabela 4. Número de <i>spots</i> comuns (<i>Match</i>) e porcentagem de <i>Match</i> entre as triplicatas dos géis de cada tempo em relação ao gel <i>Master</i> do grupo controle e infectado.	59
Tabela 5. Delineamento usado na marcação das amostras de proteínas com corantes fluorescentes (<i>Dye Swap</i>)	62
Tabela 6. Valores de <i>Dynamic Range</i> obtidos para cada gel analisado	67
Tabela 7. Diferenças qualitativas observadas entre os géis obtidos de extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóideia bovina infectados ou não por <i>Brucella abortus</i> 2308 nos tempos de 0,5 e 4 h após infecção	68
Tabela 8. <i>Spots</i> não identificados por espectrometria de massa.	71
Tabela 9. Classificação funcional, localização subcelular e grupo experimental no qual foram identificadas as proteínas expressas em células trofoblásticas infectadas ou não por <i>Brucella abortus</i> 2308 nos tempos de 0,5 h e 4 h após infecção, usando o modelo de explantes de membrana cório-alantóideia retirada de útero gestante.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da abertura do útero e confecção dos explantes da membrana corio-alantóidea. (A) Abertura do útero; (B) Membrana cório-alantóidea; (C) Posicionamento do anel de crescimento sob a região intercotiledonária da membrana cório-alantóidea; (D) Posicionamento dos suportes destacáveis e estéreis dos explantes sobre a membrana cório-alantóidea e encaixe com anel de crescimento (E) Individualização dos explantes da membrana cório-alantóidea; (F) Placa de cultivo celular de 6 poços contendo os explantes da membrana cório-alantóidea. Seta: espaço central da membrana de crescimento do inserto onde foi feita a inoculação.....42

Figura 2. Esquema das análises das imagens dos géis 2DE de amostras de *Brucella abortus* e de células trofoblásticas bovinas não infectadas e infectadas por *Brucella abortus*.47

Figura 3. Número de bactérias (log ufc/mL) internalizadas pelas células trofoblásticas dos explantes de membrana cório-alantóidea confeccionados a partir de quatro fetos coletados no terceiro trimestre de gestação. A quantificação foi realizada usando o “drop count method” (Miles e Misra, 1938) e o número de UFC foi transformado logaritmicamente.51

Figura 4. Géis SDS/PAGE a 12% de amostras de proteínas extraídas (20 µg) de explantes de membrana cório-alantóidea de bovinos infectados e não infectados por *B. abortus* 2308 corados por *Coomassie Brilliant blue* 250 R. Canaletas 1 e 11: padrão massa molecular (Da) (BenchMark® *Protein Lader* - Invitrogen, EUA); Canaletas 2, 3 e 4 - *Brucella abortus* 2308; Canaletas 5, 6 e 7 – Triplicatas trofoblastos controle 0,5 h; Canaletas 9, 10 e 11 – Triplicatas trofoblastos infectados 0,5 h; Canaletas 12, 13 e 14 – Triplicatas trofoblastos controle 4 h; Canaletas 15, 16 e 17 – Triplicatas trofoblastos infectados 4 h.....52

Figura 5. Géis 2DE 12% corados por *Coomassie Brilliant blue* G-250 (IPG pH 4 a 7, 7cm GE Healthcare, Inglaterra). (A), (B) e (C) Triplicatas das amostras de proteínas extraídas de *Brucella abortus* 2308 cultivadas por 15 h (culturas independentes) (50 µg); (D), (E) e (F) Triplicatas das amostras de proteínas extraídas de *B. abortus* 2308 cultivadas por 24 h (culturas independentes) (50 µg).....53

Figura 6. Diagrama de dispersão comparando as intensidades dos *spots* entre as triplicatas dos perfis de proteínas de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h. A) Comparação entre intensidades dos *spots* obtidas no gel *Master* (triplicata 2 – Tabela 2) e a triplicata 1. Índice de correlação: 0,925. B) Comparação entre intensidades dos *spots* obtidas no gel *Master* (triplicata 2 – Tabela 2) e a triplicata 3. Índice de correlação: 0,962.....54

Figura 7. Diagrama de dispersão comparando as intensidades dos *spots* entre as triplicatas dos perfis de proteínas de células trofoblásticas bovinas não infectadas, em relação ao gel *Master*. A) Comparação entre triplicatas tempo 0,5 h – IC: 0,795 e 0,771; B) Comparação entre triplicatas tempo 2 h – IC: 0,785 e 0,935; C) Comparação triplicatas tempo 4 h – IC: 0,906 e 0,874 e D) Comparação triplicatas obtidas tempo 8 h – IC: 0,803 e 0,857.....57

Figura 8. Diagrama de dispersão comparando as intensidades dos *spots* entre as triplicatas dos perfis de proteínas de células trofoblásticas bovinas infectadas, em relação ao gel *Master*. A) Comparação entre triplicatas tempo 0,5 h – IC: 0,858 e 0,833; B) Comparação entre triplicatas

tempo 2 h – IC: 0,808 e 0,909; C) Comparação triplicatas tempo 4 h – IC: 0,869 e 0,812 e D) Comparação triplicatas obtidas tempo 8 h – IC: 0,881 e 0,921.58

Figura 9. Gel 2DE *Master* obtido a partir de extrato proteico de explantes de membrana cório-alantóidea bovina infectados por *B. abortus* 2308 mostrando o perfil de expressão de proteínas. Os *spots* com diferença significativa da expressão ($P \leq 0,05$) quando comparados os tempos avaliados aparecem circulos em verde. *Spot* 1 – *Spot* super-expresso no tempo de 2 h em relação ao tempo de 4 h ($t = 4,64471$; $P \leq 0,05$); *Spots* 2, 3 e 4 - *Spots* super-expressas no tempo de 4 h após a infecção em relação ao tempo de 8 h ($t = 6,66817$; $t = 4,9594$; $t = 4,71528$; $P \leq 0,05$). L1, L2 e L3 - *Landmarks*: *spots* usados como referência para comparação entre os géis. 60

Figura 10. Géis 2D-DIGE 1 e 2 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308. A – Extrato proteico de trofoblastos controle 0,5 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos infectados 0,5 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extrato proteico de trofoblastos controle 0,5 h (Cy3, verde); F – Extrato proteico de trofoblastos infectados 0,5 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H - Imagens sobrepostas.63

Figura 11. Géis 2D-DIGE 3 e 4 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308 e de extratos de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h. A – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos controles 0,5 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada pro 24 h (Cy3, verde); F - Extrato proteico de trofoblastos infectados 0,5 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H- Imagens sobrepostas.64

Figura 12. Géis 2D-DIGE 5 e 6 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308. A – Extrato proteico de trofoblastos controle 4 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos infectados 4 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extratos proteico de trofoblastos controle 4 h (Cy3, verde); F – Extrato proteico de trofoblastos infectados 4 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H - Imagens sobrepostas.65

Figura 13. Géis 2D-DIGE 7 e 8 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308 e de extratos de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h. A – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada pro 24 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos controle 4 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada por (Cy3, verde); F – Extrato proteico de trofoblastos infectados 4 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H - Imagens sobreposta.66

Figura 14. Géis 2DE 12% corados por *Coomassie Brilliant blue* 250-G (IPG pH 4 a 7, 7cm GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectados por *Brucella abortus* 2308 mostrando o perfil de expressão de proteínas e *spots* selecionados para identificação por espectrometria de massa. C - *Spots* número 71 ao 95

retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas após 0,5 h de infecção por *B. abortus*. D - Spots número 100 ao 137 retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas após 4 h de infecção por *B. abortus*.69

Figura 15. Géis 2DE 12% corados por *Coomassie Brilliant blue 250-G* (IPG pH 4 a 7, 7cm GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectados por *Brucella abortus* 2308 mostrando o perfil de expressão de proteínas e Spots selecionados para identificação por espectrometria de massa. C - Spots número 71 ao 95 retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas após 0,5 h de infecção por *B. abortus*. D - Spots número 100 ao 137 retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas após 4 h de infecção por *B. abortus*. 70

Figura 16. A - Distribuição funcional das proteínas identificadas por espectrometria de massa em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea bovina nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo após análise diferencial do perfil de expressão de proteínas por 2D-DIGE. B - Distribuição funcional das proteínas identificadas por espectrometria de massa em amostras de proteínas de células trofoblásticas infectadas por *Brucella abortus* 2308 presentes nos explantes de membrana cório-alantóidea bovina após análise diferencial do perfil de expressão de proteínas por 2D-DIGE. 76

Figura 17. Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas em cada grupo experimental. I – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectadas por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 0,5 h após infecção: *biliverdin reductase A* (BLVRA), *galectin-7-like* (LGALS7), *ribosomal protein P1-like isoform 1* (RPLP1), *secretory carrier-associated membrane protein 2* (SCAMP2), *toll-interacting protein* (TOLLIP), *aldose 1-epimerase* (GALM); II – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle no tempo de 0,5 h após cultivo: *activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1* (AHSA1), *transitional endoplasmic reticulum ATPase* (VCP), *prostaglandin reductase 2* (PTGR2), *3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor* (HIBADH), *transthyretin precursor* (TTR), *cathepsin D* (CTSD), *cytokeratin 8* (KRT8), *beta-actin* (ACTB), *3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1* (BPNT1), *similar to BOLA-like protein 2 isoform 1* (BOLA2), *inositol-3-phosphate synthase 1* (ISYNA1), *dynein light chain roadblock-type 1* (DYNLRB1), *creatine kinase B-type* (CKB), *F-actin-capping protein subunit beta* (CAPZB), *serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5* (SERPINB5), *LDLR chaperone MESD* (MESDC2), *hemoglobin subunit beta* (HBB), *transgelin-2* (TAGLN); III – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle no tempo de 4 h: *gelsolin isoform a* (GSNA), *heat shock cognate 71 kDa protein* (HSC70), *endoplasmic precursor* (HSP90B1), *alpha-actinin-4* (ACTN4); IV – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectadas por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 4 h após infecção: *adenosylhomocysteinase* (AHCY), *proactivator polypeptide/prosaposin* (PSAPL1/PSAP), *ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor* (OAT), *complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor* (C1QBP), *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8* (NDUFS8), *placental prolactin* (PRCII), *ras-related protein Rab-11A* (RAB11A); Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectadas por *Brucella abortus* 2308 nos tempos de 0,5 h e 4 h após infecção: *calmodulin* (CALM1), *malate dehydrogenase, cytoplasmic* (MDH1), *thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor* (PRDX3), *abhydrolase domain-containing protein 14B* (ABHD14B), *keratin 14-like* (KRT14), *keratin, type II cytoskeletal 7* (KRT7), *high-*

mobility group box 1-like (HMGB1), *heat shock protein beta-1* (HSPB1), *beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein* (HEXB), *aldose reductase* (AKR1B1), *protein disulfide-isomerase A3 precursor* (PDIA3), *tropomyosin 4* (TPM4); Proteínas identificadas (isoformas) em mais de um grupo experimental: *Albumin protein* (ALB) – identificada em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo e infectado por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 4 h após infecção; *alpha-fetoprotein precursor* (AFP) - identificada em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo e infectado por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 0,5 h após infecção e *gelsolin isoform b* – (GSNB) - identificada em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo. 77

Figura 18. Predição das possíveis interações entre as proteínas identificadas em amostras de células trofoblásticas infectadas com *Brucella abortus* 2308. As proteínas identificadas em géis de células trofoblásticas infectadas (0,5 e 4 h) estão circuladas em vermelho: *biliverdin reductase A* (BLVRA), *galectin-7-like* (LGALS7), *ribosomal protein P1-like isoform 1* (RPLP1), *secretory carrier-associated membrane protein 2* (SCAMP2), *toll-interacting protein* (TOLLIP), *aldose 1-epimerase* (GALM), *adenosylhomocysteinase* (AHCY), *proactivator polypeptide/prosaposin* (PSAPL1/PSAP), *ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor* (OAT), *complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor* (C1QBP), *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8* (NDUFS8), *placental prolactin* (PRCII), *ras-related protein Rab-11A* (RAB11A), *calmodulin* (CALM1), *malate dehydrogenase, cytoplasmic* (MDH1), *thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor* (PRDX3), *abhydrolase domain-containing protein 14B* (ABHD14B), *keratin 14-like* (KRT14), *keratin, type II cytoskeletal 7* (KRT7), *high-mobility group box 1-like* (HMGB1), *heat shock protein beta-1* (HSPB1), *beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein* (HEXB), *aldose reductase* (AKR1B1), *protein disulfide-isomerase A3 precursor* (PDIA3), *tropomyosin 4* (TPM4). Parceiros preditos: Anexo 4. As cores das linhas indicam as possíveis associações: verde - ativação; vermelho - inibição; azul - ligação; azul claro - fenótipo; roxo - catálise; rosa - modificações pós-traducionais; preto - reação e amarelo - expressão. 79

Figura 19. Grupamentos formados na rede de predição de interação pelas proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea bovina infectados por *Brucella abortus* 2308 nos tempos de 0,5 h e 4 h pós-infecção. A – Grupamento formado por proteínas relacionadas principalmente aos mecanismos de reconhecimento do patógeno e resposta imunológica à infecção. B – Grupamento formado por proteínas relacionadas à produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e por proteínas com função antioxidante. Grupo C – Grupamento formado por proteínas relacionadas ao tráfego intracelular. D - Grupamento formado por proteínas com função estrutural e relacionadas à síntese de proteínas. As proteínas identificadas em géis de células trofoblásticas infectadas (0,5 e 4 h) estão circuladas em vermelho. Abreviaturas: *biliverdin reductase A* (BLVRA), *galectin-7-like* (LGALS7), *ribosomal protein P1-like isoform 1* (RPLP1), *secretory carrier-associated membrane protein 2* (SCAMP2), *toll-interacting protein* (TOLLIP), *aldose 1-epimerase* (GALM), *adenosylhomocysteinase* (AHCY), *proactivator polypeptide/prosaposin* (PSAPL1/PSAP), *ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor* (OAT), *complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor* (C1QBP), *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8* (NDUFS8), *placental prolactin* (PRCII), *ras-related protein Rab-11A* (RAB11A), *calmodulin* (CALM1), *malate dehydrogenase, cytoplasmic* (MDH1), *thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor* (PRDX3),

abhydrolase domain-containing protein 14B (ABHD14B), keratin 14-like (KRT14), keratin, type II cytoskeletal 7 (KRT7), high-mobility group box 1-like (HMGB1), heat shock protein beta-1 (HSPB1), beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein (HEXB), aldose reductase (AKR1B1), protein disulfide-isomerase A3 precursor (PDIA3), tropomyosin 4 (TPM4). Parceiros preditos: Anexo 4. As cores das linhas indicam as possíveis associações: verde - ativação; vermelho - inibição; azul - ligação; azul claro - fenótipo; roxo - catálise; rosa - modificações pós-traducionais; preto - reação e amarelo - expressão.81

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do protocolo experimental usado (CETEA – Protocolo 183/2010).

Anexo 2 - Proteínas identificadas por espectrometria de massa em células trofoblásticas não infectadas e infectadas nos tempos de 0,5 h e 4 h pós-infecção por *Brucella abortus* 2308. Número do *spot* se refere à identificação do *spot* nas Figuras 14 e 15.

Anexo 3 - Lista de proteínas identificadas em cada *spot* e respectivas massas e pI (preditas e experimentais).

Anexo 4 - Parceiros funcionais preditos das proteínas identificadas em amostras de células trofoblásticas bovinas infectadas na rede de interação (Figura 18).

RESUMO

Brucella abortus é considerada o principal agente etiológico da brucelose bovina, uma zoonose que provoca grandes perdas econômicas em todo o mundo. O objetivo desse estudo foi determinar o perfil diferencial de expressão proteica de células trofoblásticas bovinas nas fases iniciais da infecção por *B. abortus*. Foi usado o modelo de explantes confeccionados a partir de membrana cório-alantóidea de fetos no último trimestre de gestação infectados por suspensão de *B. abortus* 2308 (1.0×10^8 bactérias - MOI 1:1000). No estudo da cinética da infecção foram avaliados os tempos de 0,5, 2, 4 e 8 h pós-infecção no qual foi obtida reprodutibilidade alta entre triplicatas dos géis comparados (*Match* > 84%; *IC* > 0,77). O perfil de expressão de proteínas foi similar entre os tempos avaliados (*Match* > 75%). Os tempos de 0,5 e 4 h pós-infecção apresentaram as maiores diferenças qualitativas entre os géis e foram escolhidos para análise diferencial em gel (DIGE). Nessa análise não foram identificados *spots* com diferenças quantitativas significativas entre os géis comparados. Por outro lado, 103 *spots* presentes apenas em um grupo experimental foram selecionados para identificação por espectrometria de massa. As proteínas BLVRA, LGALS7, RPLP1, SCAMP2, TOLLIP, GALM, AHCY, PSAPL1/PSAP, OAT, CIQBP, NDUFS8, PRCII, RAB11A, CALM1, MDH1, PRDX3, ABHD14B, KRT14, KRT7, HMGB1, HEXB, AKR1B1, PDIA3 e TPM4 foram identificadas apenas nos extratos proteicos de células trofoblásticas infectadas. As proteínas identificadas nesse estudo servirão como alvos para novas pesquisas relacionadas à interação patógeno-hospedeiro na infecção por *B. abortus*.

Palavras chave: *Brucella abortus*, células trofoblásticas, explante, proteoma, DIGE, inflamação.

ABSTRACT

Brucella abortus is considered the main etiological agent of bovine brucellosis, a zoonotic disease that causes great economic losses worldwide. The aim of this study was to determine the differential profile of proteins expression of bovine trophoblast cells in the early stages of infection by *B. abortus*. Was used the explants model prepared from chorio-alantóidea of fetuses in the last trimester of pregnancy infected by suspending the *B. abortus* 2308 containing 1.0×10^8 bacteria (MOI 1:1000). In the study of the kinetics of infection was evaluated the times of 0.5, 2, 4 and 8 h post infection with *B. abortus*. Was obtained high reproducibility between triplicate of gels compared (*Match*> 84%; *CI* > 0.77) and the proteins expression profile was similar among the times evaluated (*Match* > 75%). Times of 0.5 and 4 h post infection showed the highest qualitative differences between the gels and were used for the differential in gel electrophoresis (DIGE). In this analysis have not been identified spots with significant quantitative differences between the compared gels. Moreover, 103 spots are present only in an experimental group were selected for identification by mass spectrometry. The proteins BLVRA, LGALS7, RPLP1, SCAMP2, TOLLIP, GALM, AHCY, PSAPL1/PSAP, OAT, CIQBP, NDUFS8, PRCII, RAB11A, CALM1, MDH1, PRDX3, ABHD14B, KRT14, KRT7, HMGB1, HEXB, AKR1B1, PDIA3 and TPM4 were identified only in protein extracts of trophoblastic cells infected by *B. abortus*. The proteins identified in this study will serve as targets for further research related to host-pathogen interaction in infection by *B. abortus*.

Key words: *Brucella abortus*, trophoblastic cells, explants, proteome, DIGE, inflammation.

1 - INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa distribuída mundialmente causada por bactérias do gênero *Brucella*. É considerada uma das mais importantes zoonoses responsável por perdas econômicas significativas decorrentes de abortos e sacrifício de animais infectados. No Brasil, a brucelose ocorre endemicamente em todo o território brasileiro (Poester *et al.*, 2002).

As principais manifestações decorrentes da infecção por *Brucella* spp. nos animais são o aborto, nascimento de animais fracos, natimortos e diminuição da produção de leite. Dez espécies são incluídas neste gênero e cada uma delas pode infectar várias espécies de animais, mas o gênero revela uma preferência quanto à escolha do hospedeiro: *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suídeos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (canídeos), *B. microti* (*Microtus arvalis*), *B. neotomae* (*Neotoma lepida*), *B. pinnipediae* (pinípedes), *B. ceti* (cetáceos) e *B. inopinata* (ser humano). Três das dez espécies de *Brucella* incluem várias biovariedades. Biovariedades 1, 2 e 3 são definidas para a espécie *B. melitensis*; *B. abortus* inclui as biovariedades 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 e *B. suis* inclui as biovariedades 1, 2, 3, 4 e 5 (Whatmore, 2009). As espécies de *Brucella* e suas biovariedades são diferenciadas de acordo com suas propriedades antigênicas e metabólicas, sensibilidade à fagos, patogenicidade e características relacionadas ao hospedeiro preferencial (Vizcaíno *et al.*, 2000).

Em bovinos o principal agente causador da brucelose é a espécie *Brucella abortus* e a infecção resulta em quadro clínico evidente em fêmeas adultas gestantes, caracterizado principalmente por aborto no último trimestre de gestação (Samartino e Enright, 1996). Em machos a alteração mais comum é a orquite (Lambert *et al.*, 1963; Trichard *et*

al., 1982), podendo estar associada à vesiculite seminal e epididimite (Rankin, 1965; McCaughey e Purcell, 1973).

As principais fontes de infecção de *B. abortus* são fetos abortados, anexos fetais e secreções uterinas de animais infectados que são eliminados após aborto ou no período pós-parto (Samartino e Enright, 1993). O risco de transmissão da brucelose bovina pela monta natural é baixo, porém, o sêmen usado em inseminações artificiais, se contaminado, constitui potencial fonte de transmissão da infecção (Rankin, 1965).

O diagnóstico clínico e epidemiológico da brucelose é baseado no histórico de ocorrência de abortos, nascimento de bezerros fracos e infertilidade de machos e fêmeas e tem um papel importante no estabelecimento da suspeita inicial da doença. A confirmação da doença é feita pelo exame direto, que é considerado conclusivo e compreende o isolamento e identificação do agente; e por exames indiretos ou sorológicos, baseados na demonstração da presença de anticorpos específicos contra a bactéria. São exemplos de exames indiretos o teste de aglutinação com antígenos acidificados tamponados (AAT) (teste de triagem), teste do anel em leite (testes de vigilância sanitária ou monitoramento), teste de Redução pelo 2-Mercaptoetanol, teste de Fixação do Complemento e ensaios imunoenzimáticos, como ELISA (provas complementares ou confirmatórias) (Nielsen e Ewalt, 2004; Poester *et al.*, 2005).

Para o diagnóstico de brucelose também são realizados testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que é capaz de amplificar seqüências específicas de espécies ou biovariedades (Leal- Klevezas *et al.*, 1995; Bricker, 2002) e variações da mesma técnica, como AMOS-PCR (Bricker e Halling, 1994), AMOS-Enhanced, AMOS-ERY-PCR (Bricker e Halling, 1995; Ocampo-Sosa *et al.*, 2005), PCR-Multiplex

(Richtzenhain *et al.*, 2002; López-Goñi *et al.*, 2008) e VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) (MLVA- typing) (Le Flèche *et al.*, 2006). Essas técnicas são ferramentas importantes de diagnóstico e de estudos epidemiológicos, pois fornecem informações relacionadas à espécie e biovariedade das amostras de *Brucella* sp. isoladas, além de diferenciarem amostras vacinais.

Em relação à capacidade de *B. abortus* de causar doença é sabido que essa bactéria possui mecanismos especiais para invadir as células do hospedeiro e sobreviver dentro delas. Estes mecanismos usados para burlar as defesas antimicrobianas do hospedeiro não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se, porém, que uma vez que *Brucella* spp. alcança o meio intracelular, desenvolve estratégias para sua sobrevivência como a interferência na formação do fagolisossoma e modificações do metabolismo celular (Campbell *et al.*, 1994).

Em relação aos estudos de perfis proteômicos resultantes da interação entre *B. abortus* e células alvo, pouco se conhece. Esses estudos são bastante desafiadores em função da alta complexidade das amostras bem como das baixíssimas concentrações de determinadas proteínas produzidas, além de requererem o uso de técnicas analíticas extremamente sensíveis. Todos os estudos proteômicos realizados até o momento usaram como modelo a infecção de células fagocíticas (DelVecchio *et al.*, 2002, Al Dahouk *et al.*, 2008; Lamontagne *et al.*, 2009) não se conhecendo ainda o perfil de expressão de proteínas de células trofoblásticas infectadas por *B. abortus* assim como quais proteínas são expressas pela bactéria durante a infecção dessas células. Contudo, o conhecimento dos perfis de expressão de proteínas tanto pela célula infectada quanto pela própria bactéria durante a infecção é muito importante, uma vez que, a interação de *B. abortus* com estas

células alvo provavelmente desempenha papel fundamental na patogênese da doença.

Neste estudo foi associado o cultivo *ex vivo* de células trofoblásticas em explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos com métodos de análise de expressão proteica, como a tecnologia de eletroforese diferencial em gel bidimensional (DIGE). A carência de informações sobre os mecanismos de interação entre *B. abortus* e células trofoblásticas bovinas justifica a realização desse estudo em que se objetiva promover a infecção experimental de células trofoblásticas com a amostra virulenta de *B. abortus*, utilizando explantes da membrana corio-alantóidea, de forma a estabelecer uma comparação entre os perfis proteicos de células trofoblásticas bovinas infectadas por *B. abortus* 2308 em diferentes tempos após a infecção.

2 - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1 - HISTÓRICO E TAXONOMIA

A Brucelose, originalmente descrita como Febre de Malta ou Febre ondulante é considerada uma das mais importantes zoonoses mundiais. Em animais de produção a doença é responsável por grandes perdas econômicas associadas ao aborto e sacrifício de animais infectados e nos seres humanos provoca uma doença febril associada a um amplo espectro de sintomas e pode ocasionalmente ser fatal (Cutler *et al.*, 2005; Boschiroli *et al.*, 2001).

Evidências de infecção por bactérias do gênero *Brucella* ocorridas há mais de 3.000 anos têm sido descritas em vários estudos. Um deles, após análise antropológica dos esqueletos de vítimas da erupção vulcânica que devastou Pompéia e Herculano em 79 a.C., revelou a presença de lesões ósseas típicas de brucelose em 17,4% dos esqueletos analisados (Capasso, 2002). Esta

incidência alta de brucelose foi teoricamente associada ao consumo de leite de ovinos e seus derivados. Outro trabalho também identificou lesões compatíveis com sacroileíte, uma complicação comum da brucelose, em 5,2% dos ossos pélvicos datados de aproximadamente 750 a.C e originados do Egito (Pappas e Papadimitriou, 2007).

Mas foi em 1887 que Sir David Bruce, médico militar britânico, identificou o agente etiológico da brucelose. Ao analisar amostras de baço colhidas em necropsia de militares lotados na ilha de Malta que haviam morrido vítimas de uma doença febril, conseguiu isolar microrganismos cocóides denominando-os de *Micrococcus melitensis* (Beer, 1999; Corrêa *et al.*, 1992).

Após a descoberta de Bruce formou-se a Comissão da Febre mediterrânea que recomendava a não ingestão de leite de cabras cru e de seus derivados, o que provocou queda acentuada no número de casos da febre de Malta entre os militares britânicos.

Anteriormente, Nocard (1885) já havia observado a presença de numerosos organismos cocóides em materiais provenientes de abortos bovinos (Corrêa *et al.*, 1992). Mas foram Bang e Stribolt (1896) que cultivaram e isolaram o agente causador dos abortos demonstrando dessa forma, ser o aborto epizoótico das vacas provocado por um bacilo que recebeu o nome de *Bacillus abortus infectiosi* (Corrêa, 1992; Ferreira *et al.*, 1990).

Alice Evans (1918), nos Estados Unidos, demonstrou a relação entre as bactérias isoladas por Bruce (1887) e por Bang (1896) e propôs a unificação das espécies descritas em um único gênero denominado *Brucella* em homenagem ao médico inglês. A alteração foi oficialmente aceita em 1920 (Corrêa *et al.*, 1992) e as espécies passaram

a ser designadas *B. melitensis* e *B. abortus*, respectivamente.

É importante ressaltar a contribuição de Themistocles Zammit, um médico natural da ilha de Malta, na identificação do agente etiológico da brucelose. Zammit não só fez a descoberta inicial de cabras naturalmente infectadas (Zammit, 1905), como também realizou vários experimentos e estudos epidemiológicos sobre a brucelose, além de elaborar testes, como o Teste de Zammit, que foram usados em estudos por outros pesquisadores (Wyatt, 2005).

Jacob Traum (1914), nos Estados Unidos, isolou a partir de amostras de fígado, estômago e rins de leitão abortado bactérias com características semelhantes ao gênero *Brucella*, o que resultou na criação de uma nova espécie chamada *Brucella suis* (Huddleson, 1929).

A associação entre uma doença genital em ovelhas na Nova Zelândia e infecção com um organismo do gênero *Brucella* foi descrita por Buddle e Boyes (1953). No mesmo ano, o isolamento de microrganismos similares ao gênero *Brucella* em carneiros naturalmente infectados (Simmons e Hall, 1953) assim como em carneiros experimentalmente infectados na Austrália também foi relatado (Buddle e Boyes, 1953). Foi então proposta a criação da espécie *Brucella ovis* (Buddle, 1956).

Mais tarde nos EUA, Stoenner e Lackman (1957) isolaram microrganismos de ratos-do-deserto (*Neotoma lepida*) e com base em seu comportamento diferencial em meio de cultura contendo corantes, as exigências de CO₂ e produção de H₂S, consideraram-no como uma nova espécie de *Brucella*, para o qual foi proposto o nome *Brucella neotomae* (Stoenner e Lackman, 1957).

Também nos EUA, nova espécie de *Brucella*

com patogenicidade para cães e para o homem foi descrita. Essa nova espécie foi chamada *Brucella canis* (Carmichael, 1967).

Durante muitos anos nenhuma nova espécie foi incluída no gênero *Brucella*. Mas em 1994 o isolamento de bactérias com características compatíveis com o gênero a partir de amostras de mamíferos marinhos foi descrito (Ross *et al.*, 1994; Ewalt *et al.*, 1994) e desde então novos relatos do isolamento de *Brucella* desses animais têm surgido (Foster *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2006). Duas novas espécies foram adicionadas ao gênero: *Brucella ceti*, isolada de cetáceos, predominantemente de botos e golfinhos, e *Brucella pinnipedialis*, associada às focas (Foster *et al.*, 2007). O potencial zoonótico de isolados marinhos têm sido demonstrado com o relato de um caso de infecção laboratorial acidental (Brew *et al.*, 1999) e três casos de infecções com manifestações neurológicas (Sohn *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2006) semelhantes às descritas em golfinhos infectados por *B. ceti* (Hernández-Mora *et al.*, 2008).

Brucella microti foi isolada de ratazanas (*Microtus arvalis*) doentes durante uma epizootia no distrito de Breclav em Moravia do Sul, República Tcheca (Scholz *et al.*, 2008a). Vários casos de isolamento de *B. microti* de raposas (Scholz *et al.*, 2009) e também de amostras de solo (Scholz *et al.*, 2008b) já foram descritos.

Brucella inopinata, uma amostra não usual de *Brucella* spp., foi isolada a partir de um implante de mama de uma paciente de 71 anos de idade nos Estados Unidos com sintomas clínicos de brucelose e reconhecida como uma nova espécie do gênero *Brucella* (Scholz *et al.*, 2010). Novo caso de infecção por essa espécie foi descrito recentemente e o isolamento da amostra foi feito a partir de um fragmento de biópsia de pulmão de um paciente australiano de 52 anos que apresentava

pneumonia obstrutiva crônica (Tiller *et al.*, 2010). O reservatório natural dessa nova espécie, no entanto, ainda não está bem estabelecido.

A descrição de infecção natural de babuínos (*Papio* spp.) mantidos em cativeiro por amostras atípicas de *Brucella* spp. foi descrita por Schlabritz-Loutsevitch e colaboradores (2009). A infecção associada ao nascimento de animais natimortos foi a primeira relatada em primatas não humanos (Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2009). Porém, essas amostras não foram ainda definitivamente classificadas.

Desta forma, atualmente dez espécies são incluídas no gênero *Brucella* e cada uma delas pode infectar várias espécies de animais, apesar de revelar preferência quanto à escolha do hospedeiro: *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suídeos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (canídeos), *B. microti* (*Microtus arvalis*), *B. neotomae* (*Neotoma lepida*), *B. pinnipedialis* (pinipenídeos), *B. ceti* (cetáceos) e *B. inopinata* (ser humano).

2.2 - CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO

Os membros do gênero *Brucella* são representados por bactérias Gram-negativo, aeróbias, não capsuladas e que não formam esporos. Embora sejam descritas como não móveis, a ausência de mobilidade de *Brucella* spp. está relacionada à inativação de genes imprescindíveis para montagem do aparato flagelar e à ausência de sistemas quimiotáticos (Chain *et al.* 2005). Podem sobreviver em meios bacteriológicos e em ambientes abertos embora prefiram o nicho intracelular (Whatmore, 2009; Seleem *et al.*, 2007).

São cocobacilos curtos medindo 0,5-0,7 μm x 0,6-1,5 μm que podem estar arranjadas na

forma individual, em cadeias curtas ou em pequenos grupos. Produzem nitrato redutase e possuem um sistema de transporte de elétrons baseado no sistema citocromo, tendo o oxigênio ou nitrato como aceptor final de elétrons. Muitas amostras requerem CO₂ para seu crescimento, especialmente no cultivo primário. As colônias no ágar dextrose ou outro meio claro são transparentes, elevadas, convexas com bordos inteiros, lisas e com superfície brilhante. Possuem cor de mel quando iluminadas com luz transmitida. A temperatura ótima para crescimento é de 37° C, ocorrendo numa faixa entre 20° C e 40° C, e o pH ótimo varia entre 6,6-7,4 (Alton, 1988).

Os genomas dos membros do gênero *Brucella* são muito semelhantes e apresentam homologia superior a 95%. Cada espécie dentro do gênero possui genoma com tamanho médio de aproximadamente 3,29 Mb que consiste em dois cromossomos circulares, o cromossomo I, com tamanho médio de 2,11 Mb e conteúdo G + C de 57,2% e cromossomo II com aproximadamente 1.18 Mb e 57,3% de conteúdo G + C (DelVecchio *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005; Tsolis *et al.*, 2009).

Todavia, polimorfismos presentes no DNA são capazes de diferenciar as espécies e em alguns casos, determina a diferenciação de algumas espécies em biovariedades. *B. melitensis* apresenta as biovariedades 1, 2 e 3; *B. abortus* as biovariedades 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 e *B. suis* as biovariedades 1, 2, 3, 4 e 5 (Whatmore, 2009; Vizcaíno *et al.*, 2000).

2.3 - CLASSIFICAÇÃO

O gênero *Brucella* pertence à ordem Rhizobiales, classe α -proteobacteria (Gupta, 2005; Williams *et al.*, 2007) e filo Proteobacteria (Ficht, 2010), tendo sua

posição filogenética confirmada com base na similaridade do cistron do DNA ribossomal e em comparações das seqüências do RNA ribossomal 16S. Na classe α -proteobacteria estão incluídas famílias de patógenos de plantas ou mamíferos ou ainda organismos simbiotes (Ficht, 2010). Embora bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* sejam patógenos intracelulares que infectam animais, elas compartilham semelhanças com organismos do solo, como *Ochrobactrum* spp., com bactérias simbiotes como *Rhizobium* spp. e com patógenos de plantas como *Agrobacterium* spp.

O gênero *Ochrobactrum* é representado por um grupo de bactérias saprofíticas que ocasionalmente infectam seres humanos. Fenotipicamente e geneticamente são os mais próximos de *Brucella* spp. (Whatmore, 2009; Godfroid *et al.*, 2011), sendo *Ochrobactrum intermedium* considerada a espécie filogeneticamente e taxonomicamente mais próxima de *Brucella* spp. com a qual compartilha 98,8% de similaridade do gene que codifica o RNA ribossomal (Godfroid *et al.*, 2011; Scholz *et al.*, 2008c).

2.4 - BRUCELOSE BOVINA

A brucelose bovina é uma zoonose distribuída mundialmente causada por bactérias do gênero *Brucella*. É responsável por perdas econômicas significativas devido aos abortos decorrentes da infecção e sacrifício de animais infectados. O principal agente causador da brucelose em bovinos é *Brucella abortus*. Outras espécies como *B. suis* e *B. melitensis* também podem causar brucelose nos bovinos e a transmissão ocorre quando estes animais estão em contato com suínos, cabras e ovinos, que são, respectivamente, os portadores naturais de *B. suis* e *B. melitensis* (Acha e Szyfres,

2003, Bovine..., 2008). É importante ressaltar que infecções por *B. melitensis* ainda não foram identificadas no Brasil (Poester *et al.*, 2002; Manual..., 2006).

A infecção por *B. abortus* resulta em quadro clínico evidente em fêmeas adultas gestantes, caracterizado principalmente por aborto no último trimestre de gestação (Samartino e Enright, 1992), sendo a placentite necrótica a principal lesão encontrada nos animais que abortam (Thoen *et al.*, 1993; Xavier *et al.*, 2009). Frequentemente é observada retenção placentária e infertilidade temporária ou permanente (Eaglesome e Garcia, 1992; Thoen *et al.*, 1993).

Em machos a alteração mais comum é a orquite (Lambert *et al.*, 1963; Trichard *et al.*, 1982) que pode estar associada à vesiculite seminal e epididimite (Rankin, 1965; McCaughey e Purcell, 1973) e ocasionar infertilidade.

Em infecções crônicas podem ser observadas lesões articulares como bursite e artrite, assim como lesões na glândula mamária. No feto abortado é observada com frequência pleurite fibrinosa, que pode estar associada à broncopneumonia supurativa e pericardite fibrinosa (Nicoletti, 1990; Xavier *et al.*, 2009).

As principais fontes de infecção de *B. abortus* são fetos abortados, anexos fetais e secreções uterinas contaminados eliminados após aborto ou no período pós-parto (Samartino e Enright, 1993). Apesar do risco de transmissão da infecção pela monta natural ser baixo, é necessário cuidado com o sêmen usado em inseminações artificiais, pois ele constitui potencial fonte de transmissão da brucelose bovina (Rankin, 1965). A transferência de embriões por sua vez, constitui uma técnica segura desde que realizada conforme recomendações internacionais (Stringfellow e Seidel, 1999).

No Brasil, a brucelose ocorre endemicamente em todo o território brasileiro (Poester *et al.*, 2002; Poester *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009) tendo sido diagnosticada em todos os estados da federação. Um estudo sorológico realizado pelo Ministério da Agricultura em 1975 demonstrou a seguinte prevalência de brucelose nas regiões do Brasil: 4,0% na região Sul, 7,5% na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 2,0% na região Nordeste e 4,1% na região Norte (Anselmo e Pavez, 1977; Poester *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram observados em estudos subseqüentes realizados nas décadas de 1980 e 1990.

Em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi criado pelo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que definiu estratégias para o controle da brucelose bovina no Brasil objetivando a criação de propriedades livres e propriedades monitoradas para ambas as doenças (Instrução..., 2004). Dentre as estratégias do programa, foi priorizada a implantação, em todo o país, do programa de vacinação obrigatória de bezerras bovinas e bubalinas de três a oito meses de idade com vacina B19 (Lage *et al.*, 2005; Manual..., 2006; Lage *et al.*, 2008).

Outras medidas adotadas foram a definição dos testes com antígeno acidificado tamponado e do teste do anel em leite (provas de rotina) e os testes do 2-mercaptoetanol e de fixação de complemento (testes confirmatórios) como provas de referência pelo MAPA; o sacrifício dos animais soropositivos; o controle do trânsito de reprodutores e normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais e a habilitação e capacitação de médicos veterinários, que para a execução de atividades de diagnóstico e participação no programa de certificação de propriedades livres ou monitoradas,

devem ser aprovados em curso de treinamento em métodos de diagnóstico e controle de brucelose e da tuberculose (Lage *et al.*, 2008).

2.5 - DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico e epidemiológico da brucelose é baseado no histórico de ocorrência de abortos, nascimento de bezerros fracos e infertilidade de machos e fêmeas e tem um papel importante no estabelecimento da suspeita inicial da doença. Sua confirmação é feita por métodos laboratoriais que são divididos em exames diretos, considerados conclusivos e exames sorológicos (Poester *et al.*, 2005).

O diagnóstico direto é feito a partir do isolamento e da identificação do agente por provas bioquímicas, como teste de sensibilidade aos corantes tionina e fucsina básica e urease, além de requerimento de CO₂, produção de H₂S, aglutinação com antisoro mono específico (Anti-A, Anti-M ou Anti-R), e susceptibilidade ao fago (Alton, 1988), testes estes considerados de referência pelo MAPA, em função de possibilitar a tipificação das amostras isoladas em espécie e biovariedades (Brasil, 2004). Porém, como *Brucella* spp. é classificada como microrganismo da classe de risco 3, sua manipulação deve ser realizada em laboratório de nível 3 de biossegurança. Esse é um fator limitante para a execução do diagnóstico direto pelo isolamento, pois sua realização depende da existência de laboratório especializado com segurança biológica adequada (Nielsen e Ewalt, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) também é uma ferramenta importante no diagnóstico da brucelose por ser capaz de amplificar seqüências específicas de espécies ou biovariedades (Leal- Klevezas *et al.*, 1995; Bricker, 2002). Técnicas derivadas da PCR, como AMOS-PCR

(Bricker e Halling, 1994), AMOS-Enhanced e AMOS-ERY-PCR (Bricker e Halling, 1995; Ocampo-Sosa *et al.*, 2005), PCR-Multiplex (Richtzenhain *et al.*, 2002; López-Goñi *et al.*, 2008) além de identificar a espécie de *Brucella*, permitem a determinação de algumas biovariedades e a identificação de infecção por amostras vacinais. Outra técnica usada na genotipificação de amostras de *Brucella* spp. é baseada na análise de lócus múltiplos de VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) (MLVA- *typing*) (Le Flèche *et al.*, 2006). Em conjunto estas técnicas fornecem dados que tornam possível o conhecimento mais detalhado da epidemiologia molecular da doença e que também podem ser aplicados em programas de controle e vigilância da brucelose (Le Flèche *et al.*, 2006).

Da mesma forma, a técnica de imunohistoquímica, que é usada para identificação direta e espacial do agente no tecido, é um método auxiliar de diagnóstico (Poester *et al.*, 2005) e tem contribuído bastante em estudos de patogenia da brucelose (Santos *et al.*, 1998; Xavier *et al.*, 2009).

Os exames sorológicos são divididos em provas de triagem (teste de aglutinação com antígenos acidificados tamponados), testes de vigilância sanitária ou monitoramento (teste do anel em leite) e em provas complementares ou confirmatórias (teste de Redução pelo 2-Mercaptoetanol, teste de Fixação do Complemento e ensaios imunoenzimáticos, como ELISA) (Poester *et al.*, 2005; Nielsen, 2004). Esses métodos diagnósticos são baseados na demonstração da presença de anticorpos específicos contra a bactéria, principalmente contra estruturas da parede celular.

Como outras bactérias Gram-negativo, o maior componente da membrana externa de *Brucella* spp. é o lipopolissacarídeo (LPS) (Cardoso *et al.*, 2006). A morfologia de suas

colônias depende da estrutura do LPS, sendo classificada em lisa ou rugosa. O fenótipo liso apresentado por algumas espécies de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti* e *B. inopinata*) é definido pela presença de um LPS completa, composto pelo lipídeo A, por um oligossacarídeo central e uma cadeia O lateral. Por outro lado, o fenótipo rugoso apresentado por *B. canis* e *B. ovis* se deve à ausência da cadeia O lateral (Caroff *et al.* 1984; McQuiston *et al.*, 1999). É exatamente o polissacarídeo O da cadeia lateral presente na molécula de LPS que induz no hospedeiro uma resposta humoral com produção inicial de IgM seguida imediatamente pela produção de IgG1 e IgG2/IgA que são produzidas em baixas concentrações (Beh, 1974; Allan *et al.*, 1976; Nielsen *et al.*, 1984).

O diagnóstico sorológico tem algumas limitações como a ocorrência de resultados falso-positivos em animais vacinados com a amostra B19, que possui fenótipo liso e que por isso induz a produção de anticorpos contra a cadeia O do LPS. A vacinação com a amostra RB51, mutante natural de *B. abortus* e que possui fenótipo rugoso, tem sido usada como alternativa para se evitar a detecção de anticorpos em testes de triagem, diferenciando animais infectados dos vacinados (Schurig *et al.*, 1991; Poester *et al.*, 2006).

2.6 - FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Brucella* spp.

Brucella spp. não possui os fatores de virulência clássicos presentes em outras bactérias patogênicas como exotoxinas, citolisinas, cápsulas, fimbrias, flagelos, fagos lisogênicos, formas de resistência, variação antigênica, LPS com baixa atividade endotóxica e indutores de apoptose. Sua patogenicidade, por outro lado, está associada à determinantes

moleculares que permitem sua invasão e multiplicação em fagócitos profissionais e não profissionais, resistindo à condições intracelulares de baixos níveis de nutrientes e oxigênio, pH ácido e intermediários reativos de oxigênio (Seleem *et al.*, 2007; Gorvel e Moreno, 2002).

Um dos principais fatores de patogenicidade de bactérias Gram-negativo é a presença do LPS com atividade endotóxica da parede celular. Em contraste, o LPS de *Brucella* spp. é centenas de vezes menos ativo e menos tóxico e provoca resposta inflamatória bem menos intensa do que o LPS de outras bactérias Gram-negativo intracelulares como *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e de alguns patótipos de *E. coli* (Dueñas *et al.*, 2004; Ritting *et al.*, 2003).

Apesar disso, vários mecanismos associados à patogenicidade de bactérias desse gênero têm sido relacionados à características distintas do seu LPS. O LPS de *Brucella* spp. por possuir o polissacarídeo O consistindo de um homopolímero linear de 4,6 - dideoxi - 4 - formamido - α - D - manopiranosil possui poucos sítios de ligação para C3 e por isso, é capaz de inibir a atividade do complemento (De Jong *et al.*, 2010; Seleem *et al.*, 2007). Além disso, é pobre indutor de explosão oxidativa, de intermediários reativos de nitrogênio e da secreção de lisozimas, todos esses mecanismos de resposta imunológica inata da célula à infecções (Seleem *et al.*, 2007). Alguns trabalhos também mostram que o LPS de *Brucella* spp. possui reduzida atividade agonista ao TLR4 (*Toll-like receptor 4*) e que apesar de ser reconhecido por esse receptor, a interação pouco está associada à produção de citocinas (De Jong *et al.*, 2010; Fugier *et al.*, 2007; Giambartolomei *et al.*, 2004).

Outro fator de virulência de *Brucella* spp. é o beta-glucano cíclico periplasmático (*Cyclic β -1,2-glucans* - C β G) que

desempenha importante função na interação bactéria-hospedeiro (Roset *et al.*, 2006). C β G interfere no tráfego intracelular ao interagir com os *lipids rafts* encontrados na membrana celular e ao prevenir a fusão fagossomo-lisossomo, o que posteriormente ocasiona a formação de um vacúolo especializado onde ocorre a multiplicação bacteriana (Seleem *et al.*, 2007). Bactérias mutantes que não expressam C β G têm sua virulência diminuída em modelos de infecção em camundongo e não se multiplicam em células HeLa (Fugier *et al.*, 2007).

A enzima superóxido dismutase (SOD) por sua vez, pertence à família de metaloenzimas, e catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. *Brucella* spp. produz uma forma de SOD citoplasmática (SOD Fe-Mn) que protege contra superóxidos endógenos produzidos pelo metabolismo aeróbico e uma periplasmática (SOD Cu-Zn) que protege a bactéria contra a explosão respiratória da célula hospedeira (Seleem *et al.*, 2007). A produção das SOD é importante para a sobrevivência intracelular de *Brucella* spp. pois evita a morte oxidativa possibilitando seu estabelecimento e manutenção no nicho intracelular.

Outras enzimas produzidas por *Brucella* spp. com potencial importância na patogenia da brucelose são a catalase e a urease. A produção de catalase protege a célula bacteriana do estresse oxidativo e a urease, por sua vez, permite a sobrevivência da bactéria durante sua passagem pelo estômago quando a infecção ocorre por via oral. Seu papel na inibição da acidificação do fagossomo pela liberação de amônia ainda não foi observada (Seleem *et al.*, 2007).

A exonuclease III, codificada pelo gene *xthA* possui um papel importante na reparação de bases de DNA pela remoção de lesões oxidativas presentes no DNA

bacteriano. O genoma de *Brucella* spp. apresenta dois genes não idênticos: *xthA-1* e *xthA-2* (DelVecchio *et al.*, 2002; Seleem *et al.*, 2007), o que potencializa sua atividade de reparação.

Outro fator importante na adaptação de *Brucella* spp. ao hospedeiro é o sistema regulatório de dois componentes. O sequenciamento do genoma de *Brucella* spp. identificou 21 sistemas regulatórios putativos. BvrS/BvrR, até agora o sistema mais bem caracterizado, é essencial na adaptação da bactéria ao ambiente fagossomal. Estudos têm demonstrado que BvrS/BvrR de *Brucella* spp. é similar aos sistemas regulatórios ChvI/ChvG de *Sinorhizobium meliloti* e *Agrobacterium tumefaciens*, que são necessários para endossimbiose e patogenicidade em plantas. Também é muito semelhante ao sistema regulatório presente em *Bartonella bacilliformis*, que também é um patógeno animal (Fugier *et al.*, 2007; Seleem *et al.*, 2007). Geralmente sistemas regulatórios são responsáveis por inativar genes desnecessários para sobrevivência extracelular e ativar genes para invasão e sobrevivência intracelulares (DelVecchio *et al.*, 2002; Seleem *et al.*, 2007). Mutantes BvrS/BvrR são menos invasivas e são incapazes de inibir a fusão do vacúolo contendo *Brucella* (VCB) com lisossomo e de se multiplicarem intracelularmente (Fugier *et al.*, 2007; Seleem *et al.*, 2007).

O sistema de secreção do tipo IV (SST4) é um fator de virulência chave para *Brucella* spp. e é responsável pela secreção de macromoléculas e proteínas através do envelope da célula bacteriana (Boschiroli *et al.*, 2002). Entretanto, o mecanismo de montagem e os fatores secretados pelo SST4 em *Brucella* spp. ainda são desconhecidos (Seleem *et al.*, 2007; Boschiroli *et al.*, 2002). No entanto, a semelhança com o SST4 do patógeno de plantas *Agrobacterium tumefaciens* sugere que possivelmente *Brucella* spp. use esse sistema para a

translocação de fatores de virulência (Seleem *et al.*, 2007; Boschiroli *et al.*, 2002).

O SST4 é composto de 12 genes que formam o operon *virB*, que é especificamente induzido pela acidificação do fagossomo em células após a fagocitose (Fugier *et al.*, 2007). O SST4 e seus efetores modulam a maturação do VCB, além de mediar a sobrevivência da bactéria nas fases iniciais e tardias da infecção. Na fase inicial, o operon *virB* impede a fusão do VCB com o lisossomo. Já na fase tardia, é indispensável para manter as interações entre VCB e retículo endoplasmático (RE) e consequente maturação do VCB (Seleem *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). O operon *virB* está associado à sobrevivência de *Brucella* por afetar a expressão de outros genes e modificar as vias de sinalização das células hospedeiras. A identificação dos genes afetados poderão providenciar mais informações sobre os mecanismos de virulência associados ao *virB* (Wang *et al.*, 2009).

Estudos também têm demonstrado que *Brucella* spp. com deleção de genes do operon *virB* foram deletados são incapazes de adquirir membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER) e perdem a habilidade de se multiplicarem em células HeLa (Seleem *et al.*, 2007; Celli e Gorvel, 2004).

Mais recentemente, um novo fator de virulência foi descrito. A proteína homóloga ao TIR (domínio intracelular Toll/interleucina -1), codificada pelo gene *tcp* (*Genes encoding domain containing-proteins*) foi identificada em *B. melitensis* (TcbB) e em amostras de *E. coli* uropatogênicas CFT073 (TcbC). Análises *in silico* demonstraram a existência de significativa homologia da estrutura terciária com domínios TIR de TLR1 de seres humanos. A proteína codificada pelo gene *tcpB* impede a sinalização via TLR (*Toll-*

like receptors) ao se ligar diretamente a MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), suprimindo a resposta imunológica inata, promovendo a sobrevivência intracelular bacteriana e patologia dos tecidos *in vivo* (Cirl *et al.*, 2008). Outros patógenos também apresentam esse gene, incluindo *B. suis*, *B. abortus* e a amostra de *S. aureus* MSSA476 (Cirl *et al.*, 2008).

Recentemente Salcedo e colaboradores (2008) identificaram em *Brucella abortus* a proteína codificada por *tcpB* e a denominaram de Btp1 (*Brucella Tir-Protein 1*). Os mesmos autores demonstraram que Btp1 contribui para inibição da maturação das células dendríticas infectadas *in vitro*, ao impedir a sinalização via TLR2 (Salcedo *et al.*, 2008).

A identificação dos fatores de virulência presentes em *Brucella* e o entendimento dos mecanismos pelos quais esses genes estão associados à sobrevivência e multiplicação da bactéria no hospedeiro são de extrema importância, pois podem contribuir para o esclarecimento da patogenia causada por *Brucella* spp.

2.7 - TRÁFEGO INTRACELULAR

B. abortus dispõem de mecanismos especiais para invadir as células do hospedeiro e sobreviver no meio intracelular. Estes mecanismos usados pela bactéria para evadir ou subverter as defesas antimicrobianas do hospedeiro não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se, porém que uma vez que *Brucella* spp. é internalizada, desenvolve estratégias para garantir sua sobrevivência, seja impedindo a fusão do fagossomo com o lisossomo, ou ainda alterando o metabolismo celular (Campbell *et al.*, 1994).

A sobrevivência de *B. abortus* no meio intracelular está relacionada à sua

capacidade de resistir ao ambiente acidificado e de inibir a formação do fagolisossomo (Porte *et al.*, 1999; Pizarro-Cerdá, 1998; Wang *et al.*, 2001). Estes processos são desencadeados a partir da internalização de *B. abortus* que redireciona o tráfego intracelular, altera a dinâmica normal de maturação dos fagossomos e bloqueia sua fusão com os endossomos e lisossomos, impedindo desta forma, a degradação da bactéria (Gorvel e Moreno, 2002).

Uma vez no hospedeiro, *B. abortus* é fagocitada por células fagocíticas profissionais ou não profissionais e após ser internalizada, pode ser destruída no interior de fagolisossomos ou sobreviver nestes compartimentos e multiplicar-se em sítios intracelulares.

A condição de opsonização de *B. abortus* é um aspecto importante na sua internalização (Campbell *et al.*, 1994; Gorvel e Moreno, 2002). Bactérias opsonizadas são internalizadas via receptores para complemento e para Fc e são mais susceptíveis à ação bactericida dos macrófagos do que bactérias não opsonizadas que, por sua vez, são internalizadas via receptores de fibronectina. No primeiro caso, a maioria das bactérias internalizadas é destruída no interior de fagolisossomos antes de atingir os sítios de multiplicação intracelulares (Campbell *et al.*, 1994; Gorvel e Moreno, 2002) demonstrando que a forma de internalização interfere no tráfego intracelular em células fagocíticas profissionais (Gorvel e Moreno, 2002).

O tráfego intracelular não é homogêneo em todas as células, todavia, os eventos ocorridos durante o trânsito de *B. abortus* em fagócitos profissionais (monócitos e macrófagos) é semelhante ao descrito em fagócitos não profissionais (células HeLa, Vero, fibroblastos e células trofoblásticas) (Jiang *et al.*, 1993, Gorvel e Moreno, 2002).

Em fagócitos profissionais (macrófagos), a internalização de *B. abortus* ocorre pela interação da cadeia O do LPS com *lipid rafts*, subdomínios da membrana plasmática que contém concentrações altas de colesterol e glicoesfingolípídeos (Roop *et al.*, 2009). Em células HeLa a internalização ocorre após uma discreta fagocitose com recrutamento moderado de filamentos de actina para o sítio de ligação e ativação de Rho GTPases (Cdc42, Rac e Rho) (Gorvel e Moreno 2002).

Dentro de 5 a 10 minutos após a internalização já se observa a formação do compartimento membranoso especializado denominado VCB que interage com endossomos primários e adquire temporariamente os marcadores Rab5 (*small GTP-binding 5*) e EEA-1 (*early endosomal antigen 1*) e receptor da transferrina (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000; Celli, 2006). Os VCB iniciais interagem transitoriamente com lisossomos, o que resulta em sua acidificação. A maturação em VCB ácidos intermediários que expressam LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*), mas não Rab7 (*small GTP-binding 7*), um importante marcador da fase tardia da via endocítica, impede a fusão com lisossomos e ocorre via LPS e de maneira dependente de β -glucano. Após 8 a 12 h, o VCB intermediário se funde RER gerando uma organela que permite a multiplicação bacteriana (Celli *et al.*, 2003; Celli e Gorvel, 2004; Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000).

Em estágios tardios da infecção, amostras de *Brucella* spp. virulentas e atenuadas seguem vias diferentes. O VCB de amostras virulentas deixa de expressar LAMP-1 e adquire vários outros marcadores de RER como calnexina, careticulina, sec61 β (*protein transport protein Sec61 subunit beta*), PDI (*protein disulfide isomerase*). A multiplicação de *Brucella* spp. ocorre com a divisão do VCB em outros nichos de multiplicação bacteriana a partir de

membranas de RER (Celli, 2006; Gorvel e Moreno 2002). Por outro lado, VCB de amostras atenuadas de *Brucella* spp., além de marcadores como LAMP-1 passam a expressar marcadores lisossomais como catepsina D, sugerindo a degradação da bactéria em lisossomos (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000).

Estudos têm demonstrado que os vacúolos de amostras de *Brucella* spp. mutantes para o operon *virB* são incapazes de completar sua maturação e de manter interações com o RER, embora uma interação inicial seja observada. Desta forma, VCB de mutantes *virB* permanecem na fase intermediária e se fundem aos lisossomos completando a via endocítica degradativa. Essas observações claramente demonstram a associação entre o SST4 de *Brucella* spp. e a maturação do VCB que ocorre a partir da sua interação com RER. A formação de compartimentos derivados de membranas do RER é essencial para a sobrevivência de *Brucella* spp. e para a sua multiplicação (Celli *et al.*, 2003; Celli e Gorvel, 2004; Celli, 2006; Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000).

2.8 - INFEÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS

A placenta de bovinos é classificada como cotiledonar sinepiteliocorial de acordo com características anatômicas e histológicas, respectivamente (Bridger *et al.*, 2007; Igwebuike, 2006). Durante o estágio de desenvolvimento embrionário, ocorre a formação no blastocisto de uma cavidade central repleta de líquido denominada blastocélio, que é coberta externamente pelo trofoectoderma, que é responsável pelo formação da placenta. Junto com o mesoderma somático (parietal), eles constituem o córion, que ao se fundir com o alantóide, uma estrutura de semelhante a um saco, forma a membrana cório-alantóide. O cório-alantóide é ricamente vascularizado

e é coberto em sua superfície externa por células do epitélio trofoectodermal. Nele existem pontos de junção materno-fetal, denominados placentomas que são formados pelo cotíledone fetal e a carúncula materna (Bridger *et al.*, 2007; Igwebuike, 2006).

As células do epitélio cório-alantóide, os trofoblastos, assumem funções especializadas. Dois tipos morfológica e funcionalmente distintos são identificados na placenta dos ruminantes: os trofoblastos mononucleados e os binucleados. As células mononucleadas são colunares cubóides que apresentam características típicas de células epiteliais. Estão primariamente envolvidas na troca de nutrientes e desempenham papel importante no reconhecimento materno da gestação e sobrevivência do feto (Igwebuike, 2006). As células binucleadas por sua vez, estão relacionadas ao processo de implantação do feto e são reponsáveis pela síntese de hormônios como lactogênio e progesterona placentários (Igwebuike, 2006).

A infecção de bovinos por *B. abortus* pode ocorrer pela conjuntiva ou mucosa respiratória por inalação (Crawford *et al.*, 1990, Ko e Splitter, 2003). Porém, a via mais comum de infecção nesses animais é o trato gastrointestinal (Payne, 1959, Crawford *et al.*, 1990). A partir daí a infecção se espalha para os linfonodos locais onde a bactéria se multiplica dentro de fagócitos (Anderson *et al.*, 1986). A invasão dos vasos linfáticos é seguido por bacteremia curta seguida de infecção sistêmica que favorece a colonização do útero gestante (Ko e Splitter, 2003). A multiplicação intensa em células trofoblásticas é diretamente associada à patologia do trato reprodutivo causada por *B. abortus* (Carvalho-Neta *et al.*, 2010).

Durante a gestação, *B. abortus* pode infectar e multiplicar dentro de células trofoblásticas da placenta provocando placentite necrótica associada a abundante

infiltrado neutrofílico (Detilleux *et al.*, 1990). *B. abortus* multiplica-se intensamente no interior das células do epitélio trofoblástico (Anderson *et al.*, 1986; Meador *et al.*, 1989) e sua afinidade por essas células está relacionada à concentração elevada de eritritol que é usada como fonte de carbono e energia (Samartino e Enright, 1993). *In vitro*, tanto o eritritol quanto a progesterona favorecem a multiplicação de *B. abortus* (Anderson *et al.*, 1986).

B. abortus infecta preferencialmente células trofoblásticas das regiões intercotiledonárias da placenta (Anderson *et al.*, 1986) em final de gestação (180 a 240 dias) (Samartino e Enright, 1996), o que está de acordo com a principal manifestação clínica observada na infecção por *B. abortus* que é a ocorrência de aborto no terço final da gestação. Por outro lado, células trofoblásticas em início de gestação (60 a 120 dias) praticamente não permitem o crescimento intracelular bacteriano (Samartino e Enright, 1996). Contudo, ainda não são estabelecidos os mecanismos de desenvolvimento das lesões inflamatórias observadas na infecção.

A intensa multiplicação bacteriana no interior das células trofoblásticas provoca sua morte, com sucessiva liberação das bactérias para tecidos e fluidos adjacentes, reiniciando o ciclo de infecção, multiplicação e morte celular. Após a infecção inicial dos placentomas eritrofagocíticos localizados na base das vilosidades coriônicas e consideradas o sítio primário da infecção, a bactéria se espalha pela placenta seguindo um padrão periplacentomal, infectando as células trofoblásticas da região intercotiledonária (Carvalho-Neta *et al.*, 2010; Anderson e Cheville, 1986).

A multiplicação de *Brucella* spp. em compartimentos endossomais é limitada e, diferente do que é observado em outras

células, o RER representa o sítio ideal para a bactéria se multiplicar (Anderson e Cheville, 1986). Apesar de pequeno número de bactérias ser observado em trofoblastos eritrofágicos e cório-alantóides próximos à base da vilosidade coriônica, a multiplicação ocorre nas cisternas do RER. Esse fato está relacionado possivelmente à síntese e glicosilação de proteínas de membrana da bactéria nessa organela (Anderson e Cheville, 1986).

Estudos sobre a interação entre *B. abortus* e células trofoblásticas são muito escassos por serem poucas as linhagens celulares bovinas de origem trofoblástica. Desta forma, o modelo de explantes da membrana cório-alantóidea, descrito por Samartino e Enright (1992), se tornou uma boa alternativa para o estudo *in vitro* da patogênese da infecção, permitindo o estudo da complexa interação entre *B. abortus* e as células do epitélio trofoblástico. Carvalho-Neta e colaboradores (2008), usando o modelo de explantes da membrana cório-alantóidea, demonstrou que *B. abortus* modula a resposta imunológica inata desencadeada pelas células trofoblásticas, inibindo a transcrição de mediadores proinflamatórios nas fases iniciais da infecção. Contudo, a maior parte dos estudos sobre a patogênese da *B. abortus* têm usado células fagocíticas ou linhagens celulares epiteliais pouco diferenciadas e de órgãos que não são os principais alvos da infecção por *B. abortus*.

Desta forma, o entendimento da interação entre *B. abortus* e as células do epitélio trofoblástico é de fundamental importância para a compreensão da patogênese e da ocorrência do aborto causado pela infecção.

2.9 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR *Brucella abortus*

Após a infecção por *B. abortus* vários mecanismos de resposta imunológica do

hospedeiro são ativados em decorrência da presença do patógeno. A resposta imunológica inata ou inespecífica desempenha papel relevante na infecção por *B. abortus*, reduzindo o número inicial de bactérias e ativando a resposta imunológica adquirida (Golding *et al.*, 2001; Ko e Splitter, 2003).

Na imunidade inata estão envolvidas células fagocíticas, dentre elas os neutrófilos e, especialmente, os macrófagos. No entanto, para serem ativados é necessário que *B. abortus* seja reconhecida pela superfície celular destes fagócitos. Os receptores semelhantes ao Toll (TLR - *Toll-like receptors*), moléculas consideradas sentinelas do sistema imunológico inato que são expressas em diferentes tipos celulares são um dos responsáveis por esse reconhecimento. Os TLR formam uma classe de proteínas similares à proteína codificada pelo gene *toll* de *Drosophila melanogaster* que nesta espécie, desempenha função de defesa contra microrganismos e está relacionado à formação do tubo neural (Medzhitov *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998; Kopp e Medzhitov, 1999).

O reconhecimento de *Brucella* sp. pelos TLR é importante para o estabelecimento de uma resposta eficaz, uma vez que este culmina na polarização da resposta imune para o perfil Th1, determinante no controle da infecção por esta bactéria (Golding *et al.*, 2001) e a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ (Carvalho-Neta *et al.*, 2008; Giambartolomei *et al.*, 2004).

A capacidade dos TLR reconhecerem bactérias do gênero *Brucella* ainda gera controvérsias. Estudos usando diferente modelos de infecção têm demonstrado que *B. abortus* é reconhecida *in vitro* por TLR2 (Campos *et al.*, 2004; Giambartolomei *et al.*, 2004), TLR4 (Campos *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2004) e TLR9 (Huang *et al.*, 2005;

Macedo *et al.*, 2008) e que MyD88 possui papel importante na eliminação da infecção (Weiss *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2008). MyD88 também é capaz de induzir a expressão de Irgm3 e Irga6, GTPases de 47 kDa membros da família IRG (*immunity-related GTPases* ou p47 GTPases) envolvidas na resposta do hospedeiro contra patógenos intracelulares (Howard, 2008; Taylor *et al.*, 2007) e que essa indução ocorre via IFN tipo 1 sem a participação de TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 (Lapaque *et al.*, 2009). Por outro lado, apesar de reconhecerem *B. abortus*, TLR2 e TLR4 não são essenciais no controle da infecção (Weiss *et al.*, 2005).

De forma geral, TLR4 é considerada a molécula mais importante no momento da infecção por *B. abortus* (Campos *et al.*, 2004, Dueñas *et al.*, 2004). O LPS da *Brucella* destaca-se pela característica na sua composição estrutural distinta de outras bactérias Gram-negativo, como as enterobactérias, que possuem modelos clássicos de LPS que interagem com TLR4 determinando intensa resposta inflamatória no hospedeiro (Cardoso *et al.*, 2006). Essa diferença no LPS de *B. abortus* não interfere na sua interação com TLR4, contudo, a resposta inflamatória do hospedeiro, resultante da sinalização por esta molécula, é bem menos intensa nas fases iniciais da infecção quando comparada à outras bactérias intracelulares Gram-negativo como *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e amostras patogênicas de *E. coli* (Dueñas *et al.*, 2004; Ritting *et al.*, 2003). Já MyD88, a principal molécula transdutora de sinal ativada pelos TLR, assume papel determinante no desenvolvimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro à infecção por *B. abortus* (Weiss, *et al.*, 2005).

Estudos recentes também têm demonstrado que *Brucella* spp. é capaz de subverter a sinalização via TLR para evadir dos mecanismos de resposta do sistema imunológico. TcpB, uma proteína homóloga

ao domínio TIR produzida por *Brucella* spp. impede a sinalização pelo TLR4 e TLR2 ao se ligar diretamente à MyD88 (Cirl *et al.*, 2008). TcpB promove a inibição da maturação de células dendríticas infectadas por *B. abortus* 2308 ao interferir no padrão de sinalização via TLR2 (Salcedo *et al.*, 2008). TcpB se assemelha à molécula adaptadora MAL sendo capaz de se ligar à fosfoinositídeos (Radhakrishnan e Yu, 2009) e de inibir a sinalização via TLR2 e TLR4 pela ubiquitinação e degradação de MAL. Mutantes que não expressam TcpB não conseguem reduzir os níveis de MAL produzidos por macrófagos infectados (Sengupta *et al.*, 2011).

Os receptores NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) também podem desempenhar papel relevante no reconhecimento de *Brucella* spp. que é um patógeno intracelular cuja parede celular contém peptidoglicano. Os NOD são receptores do sistema imunológico inato envolvidos em uma variedade de funções associadas à regulação da resposta inflamatória e da ativação da apoptose. Dentre os mais bem descritos estão NOD1 e NOD2. NOD1 reconhece moléculas contendo ácido D-glutamil-meso-diaminopimélico (iE-DAP), comumente encontrado em bactérias Gram-negativo e também resultante da degradação de peptidoglicanos. O NOD2 por sua vez, reconhece *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, e a estrutura essencial que se liga ao receptor é o muramildipeptídeo (MDP) derivado da degradação de peptidoglicanos e *motif* bioativo mínimo presente na parede celular de bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. Uma vez ativadas, esses receptores induzem transcrição de genes via NF- κ B e vias de sinalização MAPK (Rosenstiel e Schreiber, 2009).

Em relação ao reconhecimento de *Brucella* spp. pelos receptores NOD, estudos iniciais demonstraram que NOD2 não desempenha

papel relevante no controle da infecção *in vivo* por *B. abortus* (Oliveira *et al.*, 2008). Estudos adicionais são necessários para investigar possível associação entre infecção por *Brucella* spp. e resposta inflamatória via NOD.

A resposta imunológica inata também pode ser desencadeada pelo reconhecimento do patógeno por outras moléculas. As proteínas plasmáticas que compõem o sistema complemento participam primariamente na resposta imunológica inata do hospedeiro infectado por *B. abortus*. Seus mecanismos de atuação são a opsonização e eliminação imediata da bactéria extracelular ou ainda podem interagir com bactérias neutralizadas por anticorpos (Corbeil *et al.*, 1988). O LPS de *Brucella* spp. por possuir poucos resíduos hidroxila, sítios de ligação para o componente C3 da cascata do complemento, previne a geração de produtos pró-inflamatórios como C3a e C5a. Desta forma, características inerentes ao LPS de *Brucella* spp. provoca a diminuição da resposta inflamatória por diminuir a deposição de C3 (DeJong *et al.*, 2010).

As células *natural killer* (NK) também são componentes da resposta imunológica inata e sua atividade citotóxica e bactericida na infecção por *B. abortus* já foi demonstrada *in vitro* em macrófagos humanos (Salmeron *et al.*, 1992). Agem diretamente contra *B. abortus*, ou ainda, são responsáveis pela secreção de IFN- γ (Golding *et al.*, 2001), citocina que atua sobre macrófagos estimulando sua atividade bactericida (Oliveira *et al.*, 2002; Wyckoff III, 2002).

A explosão oxidativa e a utilização dos reativos intermediários de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) por macrófagos para redução do número de bactérias intracelulares também têm sido demonstrada na infecção por *B. abortus*. Estudos *in vitro* usando macrófagos murinos e posteriormente camundongos *knockout* demonstraram o papel, particularmente, dos

reativos intermediários de oxigênio no controle da sobrevivência intracelular de *B. abortus* durante a fase inicial da infecção (Jiang *et al.*, 1993).

A resposta imunológica inata é importante no controle inicial da infecção por *B. abortus* em bovino. Porém, a resposta mais efetiva no controle da infecção é a imunidade adquirida mediada por células e é desencadeada pela ativação de linfócitos T específicos (Oliveira *et al.*, 1998). O reconhecimento de *B. abortus* pelos linfócitos T ocorre pelos seus receptores α/β ou γ/δ , em associação com a molécula co-receptora CD4⁺, em linfócitos T auxiliares ou CD8⁺, em linfócitos T citotóxicos. Esses co-receptores determinam a classe do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) na célula apresentadora de antígeno, onde serão processados os fragmentos peptídicos da proteína antigênica apresentada a célula T (Janeway, 1992). Na infecção por *B. abortus*, as bactérias podem ser apresentadas por ambos os mecanismos: através do MHC de classe II, reconhecidas por receptores de células T α/β CD4⁺ ou através do MHC de classe I reconhecidas por receptores de células T α/β CD8⁺ (Janeway, 1992; Wyckoff III, 2002). Os receptores de células T γ/δ geralmente não expressam CD4⁺ ou CD8⁺, não sendo, portanto a sua via de apresentação bem definida (Janeway, 1992).

Os linfócitos T CD4⁺ são ativados pela secreção da citocina IL-12 por macrófagos infectados com *B. abortus* *in vitro* e *in vivo* (Jones e Winter, 1992; Jiang e Baldwin, 1993; Stevens *et al.*, 1992) que promove a diferenciação dos linfócitos T auxiliares em linfócitos T CD4⁺ subtipo 1 (Th1). Embora haja discussão em relação à polarização de uma via de ativação, a resposta desenvolvida pelo hospedeiro infectado por *B. abortus* é considerada do tipo Th1 pelo perfil de citocinas produzidas durante a infecção (Mossman e Coffman, 1989). Por outro

lado, citocinas associadas à resposta imunológica tipo Th2 também são produzidas durante a infecção por *B. abortus* limitando a resposta inflamatória (Golding *et al.*, 2001).

Os linfócitos T CD4⁺ e suas citocinas do tipo Th1, produzidas em resposta a ativação antígeno-específica, representam importante mecanismo de defesa do hospedeiro bovino. Por outro lado, a ativação de linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) desempenha papel fundamental na imunidade protetora à infecção por *B. abortus* (Oliveira *et al.*, 1998) e sua atividade citotóxica é considerada a resposta imunológica celular de maior eficácia no controle da infecção por *B. abortus* (Oliveira e Splitter, 1995; Oliveira *et al.*, 2002).

2.10 - ESTUDOS PROTEÔMICOS

O termo proteoma foi primeiramente empregado por Wilkins e foi definido como a caracterização em larga escala do conjunto total das proteínas das células, tecidos, ou organismos expressos em um tempo determinado e sob condições definidas (Wilkins *et al.*, 1996; Kazmi e Krull, 2001). Trata-se de uma área interdisciplinar da ciência, na qual estão agregadas principalmente a química, biologia e informática (Tyers, 2003; Aebersold, 2003; Ong e Mann, 2005).

A necessidade de se realizar estudos proteômicos advém do fato de que os organismos têm vários mecanismos de controle das funções celulares e que as proteínas medeiam grande parte dos eventos biológicos que ocorrem na célula. Vários eventos celulares como modificações pós-transcricionais (*splicing*) e pós-traducionais (glicosilação, fosforilação, metilação), tradução de diferentes produtos proteicos a partir de único gene impedem que se faça corretamente correlação direta entre RNA e

proteínas, sendo necessários estudos que avaliem qualitativamente e quantitativamente perfis proteicos expressos em determinadas situações (Tannu e Hemby, 2006).

Inicialmente, o objetivo da pesquisa proteômica era identificar e caracterizar proteínas (Wu *et al.*, 2006). Os avanços em cromatografia, espectrometria de massa e bioinformática permitiram que novos estudos pudessem ser realizados. Adicionalmente às técnicas tradicionais que eram capazes de investigar uma ou poucas proteínas ao mesmo tempo, o desenvolvimento de tecnologias proteômicas possibilitou a análise de um grande número e até mesmo de centenas de proteínas, além de permitir a análise de múltiplas amostras. Mais do que a identificação de proteínas, novas técnicas desenvolvidas tornaram possível a quantificação de alterações da expressão de amostras proteicas.

A eletroforese bidimensional (2DE) é a técnica mais comumente usada em estudos proteômicos. Os fundamentos desta abordagem foram apresentados pela primeira vez por O'Farrell (1975) e Klose (1975) (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Desde então, têm-se verificado melhoramentos substanciais na qualidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos, em consequência do desenvolvimento de equipamentos e reagentes específicos.

Um desdobramento da 2DE é a chamada eletroforese diferencial em gel 2D (DIGE), que permite a marcação dos grupos lisina das proteínas com cianina (Cy) antes da focalização isoelétrica. Essa técnica permite a marcação de 2 a 3 amostras com diferentes corantes correndo-as no mesmo gel 2DE, reduzindo assim, variabilidade entre os padrões de *spots* entre os géis, além de diminuir o número de géis por experimento. Outra vantagem é a inclusão de uma amostra padrão em cada gel,

constituída de quantidades iguais de cada amostra experimental comparada e que é usada para normalizar as medidas de abundância de proteínas entre vários géis de um experimento (Wu *et al.*, 2006).

Outros métodos de quantificação de proteínas foram descritos recentemente. O iCAT (*Isotope-coded affinity tags*) é baseado na adição de uma etiqueta que tem afinidade por resíduos de cisteína e que possui uma molécula ligada de oito átomos de hidrogênio ou oito átomos de deutério (cadeia leve e pesada). Uma amostra é marcada com a etiqueta contendo hidrogênio e a outra amostra com a etiqueta contendo o deutério. Após digestão das proteínas, os peptídeos resultantes são identificados por MS. Peptídeos iguais marcados nas duas amostras são identificados pela sobreposição dos picos que apresentaram m/z (razão massa-carga) distintas devido ao tipo de isótopo ligado, sendo a relação entre a área dos dois picos uma medida relativa da expressão daquela proteína (Yi e Goodlett, 2004).

Essa técnica possui algumas desvantagens como a não identificação de proteínas com pouco ou nenhum resíduo de cisteína; a perda de informações de modificações pós-traducionais e complicada interpretação dos resultados MS/MS devido à adição do grupo biotina. A adição de um novo sítio de clivagem com emprego de isótopos ¹³C (ciCAT) e um grupo biotina com clivagem ácida foram modificações da técnica para tentar minimizar suas limitações (Yi e Goodlett, 2004).

O iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*) também é uma técnica baseada na marcação de proteínas com etiquetas e identificação por MS. Os reagentes (4-plex ou 8-plex) são isobáricos e adicionam uma massa de 145 Da ao peptídeo após marcação (Schmid e Urlaub, 2009). Essas etiquetas se ligam à porção N-terminal dos grupos amina livres de todos

os peptídeos e nas cadeias laterais internas com resíduos de lisina. As etiquetas variam em função do grupo reporter que carregam, podendo ter 114, 115, 116 ou 117 Da, o que possibilita a quantificação de proteínas em até quatro tipos de amostras ao mesmo tempo. A quantificação relativa é realizada da mesma forma que no iCAT.

Aliada aos géis bidimensionais e outros métodos de quantificação de proteínas, a espectrometria de massa (MS) tem se mostrado ferramenta ideal para aplicações proteômicas, fato este atribuído a sua capacidade de analisar proteínas e peptídeos com alta especificidade, precisão, velocidade e sensibilidade. Apesar da MS ser uma técnica centenária, sua aplicabilidade na análise de proteína tornou-se notória e praticamente imprescindível somente depois do desenvolvimento das técnicas brandas de ionização (ESI – *Electrospray ionization* e MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), ocorridas no final dos anos 1980.

A partir do aprimoramento do 2DE com o emprego de tiras IPG (gradiente de pH imobilizado), do desenvolvimento de variações da técnica como o emprego de corantes mais sensíveis como SYPRO® Ruby, DIGE, e de outras técnicas de quantificação como iCAT e iTRAC que aumentaram a capacidade de resolução e sensibilidade, e também do MALDI-MS que permitiu a identificação rápida e em larga escala de proteomas inteiros, estudos proteômicos objetivando a determinação do perfil de expressão de proteínas das espécies de *Brucella* e da interação bactéria-hospedeiro têm sido extensivamente realizados.

2.11 - ANÁLISE PROTEÔMICA E INFECÇÃO POR *Brucella* spp.

Os primeiros estudos que revelaram os grupos de proteínas expressas pelas várias espécies de *Brucella* usavam SDS/PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate/PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) e/ou *immunoblotting* (Morris, 1973; Santos *et al.*, 1984) e em geral, demonstraram que cada espécie apresentava padrões próprios de bandas de proteínas (Tabatabai e Deyoe, 1984; Verstrete e Winter, 1984; Verstrete *et al.*, 1982).

Um dos primeiros estudos a usar géis bidimensionais para avaliar o proteoma de *B. abortus* foi realizado por Sowa *et al.* (1992) e comparou os perfis de expressão de proteínas de amostras vacinais e virulentas de *B. abortus* cultivadas em laboratório. Mais tarde, novos estudos proteômicos de *B. abortus* demonstraram existência de variação da expressão de proteínas dependendo das condições de crescimento (estresse ácido, oxidativo, nutricional ou térmico; infecção em macrófagos) (Lin e Fitch, 1995; Rafie-Kolpin *et al.*, 1996). O primeiro estudo que caracterizou o perfil de proteínas expressas pela amostra *B. melitensis* B1115 e por *B. ovis* cultivadas em condições de laboratório usando géis 2DE corados por prata foi realizado por Teixeira-Gomes (1997). Em todos os trabalhos citados acima, apenas 54 proteínas foram identificadas por sequenciamento de Edman ou *Western blotting*.

A partir do aprimoramento das técnicas de análise proteômica e de identificação de proteínas novos trabalhos foram realizados.

Wagner e colaboradores (2002) realizaram um estudo proteômico visando identificar e caracterizar proteínas expressas por *B. melitensis*. Nesse estudo foram detectados 883 *spots* de proteínas dos quais 440 foram identificados por espectrometria. O mapa

proteômico resultante desse estudo foi importante por servir de base de comparação para outros trabalhos que investigaram diferentes condições experimentais, como crescimento *in vivo*, além de ajudar na compreensão da biologia celular de *B. melitensis* e das vias bioquímicas associadas com virulência, patogenicidade, especificidade ao hospedeiro ou respostas ao estresse (Wagner *et al.*, 2002).

Eschenbrenner *et al.* (2006), usando 2DE corado por SYPRO® Ruby, compararam o perfil de expressão de proteínas de *B. melitensis* 16M e *B. abortus* 2308 e identificaram diferenças quantitativas e qualitativas entre os perfis de expressão das duas amostras possivelmente relacionadas à especificidade quanto ao hospedeiro preferencial (Eschenbrenner *et al.*, 2006).

Connolly *et al.* (2006) identificaram proteínas candidatas ao desenvolvimento de vacinas ao analisarem o perfil proteico do envelope celular de *B. abortus* 2308 usando 2DE/Western blotting. Um total de 332 proteínas de envelope celular foi detectado nos géis 2DE e destas, 163 foram identificadas por espectrometria de massa. Foram identificadas 42 proteínas imunogênicas, que podem ser usadas para o desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes (Connolly *et al.*, 2006).

Outro estudo demonstrou a existência de diferenças no perfil de expressão proteica entre amostra selvagem de *B. melitensis* e da mutante BM Δ virB crescidas em condições experimentais nas quais o operon virB estava ativado. O trabalho identificou 44 proteínas com diminuição e 18 com aumento na expressão. Proteínas associadas com sobrevivência intracelular, incluindo VJbR, DnaK, HtrA, OMP25 e GntR apresentaram expressão diminuída em BM Δ virB em relação à amostra selvagem (Wang *et al.*, 2009).

Uzureau e colaboradores (2010) compararam o perfil de expressão de proteínas da amostra selvagem *B. melitensis* 16M e o das amostras mutantes BM Δ vjbR e BM Δ babR. Os genes deletados, vjbR e babR parecem estar associados ao sistema Quorum Sensing (QS) da bactéria e a infecção por essas amostras têm se mostrado atenuada em todos os modelos experimentais. Após análise dos géis 2D-DIGE foram selecionadas 101 proteínas que apresentavam diferenças na expressão entre as amostras avaliadas para serem identificadas por espectrometria de massa. Destas, 35 proteínas são reguladas direta ou indiretamente por VjbR e 66 por BabR e estão relacionadas com resposta ao estresse, metabolismo e virulência e sugere que o sistema de QS de *B. melitensis* pode ter um papel de regulação fina na adaptação ao meio intracelular (Uzureau *et al.*, 2010).

O perfil proteômico da amostra *B. suis* 1330 em condições de baixa oxigenação (microaerobiose e anaerobiose) foi comparado ao perfil de expressão de proteínas de *B. suis* cultivada em aerobiose por Al Dahouk *et al.* (2009). Após comparação entre os géis 2D-DIGE foi observado que dos 1042 spots detectados na amostra controle (*B. suis* em aerobiose), 19 proteínas (isoformas) apresentaram aumento na expressão e em sua maioria, eram enzimas relacionadas à produção de energia. Por outro lado, 18 proteínas apresentaram diminuição da expressão em relação ao controle. A maior parte delas era de proteínas que participam do metabolismo DNA/RNA e tradução e estão relacionadas como efeito que o baixo nível de oxigênio promove no crescimento bacteriano (Al Dahouk *et al.*, 2009).

Delpino e colaboradores (2009) detectaram 36 spots de proteínas presentes apenas no sobrenadante do cultivo de *B. abortus* 2308 e ausentes na composição do sobrenadante do mutante polar Δ virB10. Por espectrometria de massa 11 proteínas foram

identificadas. Após realização de *Western blot*, os autores identificaram três proteínas, DnaK, PPIase e CGH, que podem ter sua liberação afetada por genes do operon *virB* (Delpino *et al.*, 2009).

Em relação aos estudos de perfis proteômicos resultantes da interação entre *Brucella* spp. e células alvo, pouco se conhece, pois esses estudos são bastante desafiadores devido à complexidade das amostras proteicas e também devido às baixíssimas concentrações de determinadas proteínas produzidas, o que requer o uso de técnicas analíticas extremamente sensíveis.

Com dito anteriormente, um dos primeiros trabalhos visando analisar o perfil proteômico de *B. abortus* em células infectadas por 2DE foi realizado por Lin e Ficht (1995). Os autores caracterizaram a síntese de proteínas das amostras *B. abortus* 2308, *B. abortus* B19 e *B. abortus* RB51 após infecção em macrófagos da linhagem J774A.1 comparando os resultados o perfil obtido após o crescimento das amostras *in vitro*. Nessa análise foram usados géis SDS/PAGE e géis 2DE e três proteínas com aumento significativo da expressão, com massas moleculares estimadas em 62, 28 e 17 kDa foram observadas. Apenas a proteína com massa de 62 kDa foi identificada por imunoprecipitação como Hsp62 (Lin e Ficht, 1995).

Outro trabalho pioneiro foi o realizado por Rafie-Kolpin e colaboradores (1996) que compararam o perfil proteômico de *B. abortus* 2308 após crescimento em meio de cultura, infecção em macrófagos bovinos e também sob estresse. Foram detectadas diferenças entre os perfis proteômicos obtidos das três condições experimentais, porém os *spots* diferencialmente expressos não foram identificados.

Al Dahouk e colaboradores (2008) caracterizaram o perfil de proteínas expressas por *B. suis* após 48 h de infecção

em macrófagos murinos usando 2D-DIGE em um modelo de subtração. Os autores identificaram 168 proteínas de *B. suis* que apresentaram alteração na expressão quando comparado com o perfil da bactéria crescida em meio de cultivo na fase estacionária. Das 168 proteínas com alteração, 44 proteínas foram identificadas apenas durante a infecção intramacrofágica, sendo a maioria envolvida com o metabolismo bacteriano e 40% delas expressas em baixas concentrações (Al Dahouk *et al.*, 2008).

Lamontagne *et al.*, (2009) por sua vez, compararam o perfil de expressão de *B. abortus* 2308 e da amostra atenuada *B. abortus* B19 após 3, 20 e 44 h de infecção em macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 (ATCC TIB-71). Na amostra virulenta *B. abortus* 2308, houve maior expressão proteica diferencial no início da infecção, sendo que a maioria das proteínas diferencialmente expressas apresentava níveis diminuídos. Na infecção pela amostra vacinal B19 este pico foi observado na fase tardia da infecção (Lamontagne *et al.*, 2009).

Todos os estudos realizados até o momento que avaliaram a interação *Brucella* spp. e células alvo usaram como modelo a infecção de células fagocíticas (Al Dahouk *et al.*, 2008; Lamontagne *et al.*, 2009) não se conhecendo ainda o perfil de expressão de proteínas de células trofoblásticas infectadas por *B. abortus*. A carência de informações sobre os mecanismos de interação entre *B. abortus* e células trofoblásticas bovinas justifica a realização desse estudo em que se objetiva promover a infecção experimental de células trofoblásticas com a amostra virulenta *B. abortus* 2308, utilizando explantes da membrana corioalantóidea, de forma a estabelecer uma comparação entre os perfis proteicos de células trofoblásticas bovinas infectadas e não infectadas por *B. abortus* 2308 em diferentes tempos após a infecção.

A determinação do perfil proteômico de células trofoblásticas bovinas infectadas por *B. abortus* é extremamente importante, uma vez que a interação de *B. abortus* com estas células alvo provavelmente desempenha papel fundamental na patogênese da doença.

3 - HIPÓTESE

A análise proteômica diferencial de células trofoblásticas bovinas infectadas por *B. abortus* identifica proteínas diferencialmente expressas importantes para a infecção e sobrevivência intracelular da bactéria e relacionadas à resposta do hospedeiro nas fases iniciais da infecção.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo Geral

O objetivo desse estudo é realizar a análise proteômica diferencial de células trofoblásticas bovinas infectadas pela amostra *Brucella abortus* 2308.

4.2 - Objetivos específicos

I. Determinar o perfil proteico de *B. abortus* 2308 (cultivo por 15 ou por 24 h);

II. Determinar e comparar os perfis proteicos de células trofoblásticas bovinas infectadas e não infectadas por *B. abortus* 2308 em quatro tempos após a infecção: 0,5 h, 2 h, 4 h e 8 h (cinética da infecção);

III. Identificar as proteínas expressas diferencialmente em células trofoblásticas bovinas infectadas por *B. abortus* 2308 usando o modelo de explantes da membrana cório-alantóidea.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Cultivo da amostra de *Brucella abortus* 2308 para obtenção de proteína total bacteriana

Foram feitas três culturas independentes da amostra *B. abortus* 2308, cedida por Sílvio Cravero do INTA-Castelar/Argentina em 500 mL de caldo *Brucella* (Difco, USA) por 15 h (fase logarítmica) e por 24 h (fase estacionária) a 37°C sob agitação (200 rpm). Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas em tubos de polipropileno de fundo cônico, 50 mL por vez, por 10 minutos a 1000 xg, o sobrenadante descartado e o sedimento de cada triplicata ressuspensionado em 50 mL de meio de cultura RPMI 1640 sem bicarbonato (Invitrogen, USA). Esse procedimento foi repetido por três vezes para retirar qualquer resíduo do meio de cultura bacteriano e após a terceira lavagem e centrifugação, o sobrenadante foi completamente descartado e o sedimento bacteriano de cada triplicata foi congelado imediatamente a -80°C nos próprios tubos de polipropileno em que foram centrifugados. A manipulação do agente e material infectado foi realizada em condições de biossegurança de nível 3 (Richmond e McKinney, 1993; Teixeira e Valle, 1996).

5.2 - Extração de proteínas totais de *Brucella abortus* 2308

Para extração de proteínas totais de *B. abortus* 2308, foram adicionados aos sedimentos bacterianos 500 µL de tampão de lise contendo uréia (8M), tiuréia (2M), CHAPS (4% w/v), Tris 1M (40 mM) (GE Healthcare, Inglaterra) e mix de inibição de proteases (GE Healthcare, Inglaterra). Os tubos de polipropileno de fundo cônico de 50 mL contendo o lisado bacteriano foram então mantidos sob agitação lenta (50 rpm) em agitador orbital para placas (KS 250

basic – IKA Labortechnik – Alemanha) a temperatura ambiente por duas horas. Após esse tempo, os lisados bacterianos foram passados por agulha (26 G) para completar a lise celular e então, centrifugados por 30 minutos a 20.000 xg. O sobrenadante contendo as proteínas foi recolhido e dividido em alíquotas de 30 µL que foram mantidas a -80°C.

5.3 - Cultivo da amostra de *Brucella abortus* 2308 e preparo do inóculo para infecção em células trofoblásticas

O inóculo foi preparado a partir do crescimento da amostra *B. abortus* 2308 em caldo *Brucella* (Difco, USA) por 12-15 h de incubação a 37°C sob agitação (200 rpm). Em seguida, a densidade óptica bacteriana foi determinada por espectrofotometria (OD₆₀₀) e posteriormente ajustada para 1,0 x 10⁸ bactérias. Para confirmação da densidade óptica bacteriana do inóculo determinada por espectrofotometria foram feitas diluições seriadas na base 10 do inóculo em PBS (pH 7,4) e o número de bactérias também foi determinado pelo “drop count method” (Miles e Misra, 1938). A manipulação do agente e material infectado foi realizada em condições de biossegurança de nível 3 (Richmond e Mckinney, 1993; Teixeira e Valle, 1996).

5.4 - Confecção de explantes de placenta de bovinos - Coleta da membrana cório-alantóidea de bovinos e confecção dos explantes

O estudo foi realizado usando o sistema de insertos Snapwell (*Transwell® Cell Culture Permeable Supports – Snapwell™ Inserts - Corning Incorp.*, NY) de membrana cório-alantóidea, baseado na metodologia descrita por Samartino e Enright (1992) e modificada por Carvalho-Neta *et al* (2008). Para isso, foram obtidos quatro úteros bovinos intactos no terço final de gestação em abatedouros de Belo Horizonte-MG. A

idade gestacional foi estimada pela medida cefalococcígea (CR - *Crown-Rump length*) (Evans e Sack, 1973). Foram usadas apenas as placentas provenientes de fetos com 65 a 83 cm de comprimento, correspondente a 180 - 240 dias ou último trimestre de gestação e com resultado negativo para *Brucella* spp. ao teste sorológico Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) usando líquido amniótico do feto coletado (Brasil, 2004). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA – Protocolo 183/2010) (Anexo 1). O material foi encaminhado rapidamente (tempo máximo de duas horas) ao laboratório de Patologia Molecular – Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG), onde foi feita assepsia cuidadosa do perimétrio, usando álcool iodado, seguida da abertura do útero (Figura 1A) com exposição e retirada asséptica da membrana cório-alantóidea (Figura 1B), onde se localizam as células trofoblásticas. No interior da capela de fluxo laminar, a membrana foi mantida por 20 minutos em meio de cultura RPMI 1640 estéril (Invitrogen, USA) contendo antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). A seguir, a membrana foi lavada duas vezes em meio de cultura RPMI (Invitrogen, USA) a 37°C e estéril para completa remoção do antibiótico.

Para confecção dos explantes, os anéis dos suportes destacáveis e estéreis foram posicionados sobre a membrana cório-alantóidea, nas porções intercotiledonárias, em contato com as células do epitélio trofoblástico, e então delicadamente pressionados contra a membrana do explante (Figura 1C e D). Com o auxílio de uma tesoura estéril, o excesso de tecido foi retirado em torno dos anéis do suporte para individualização dos explantes (Figura 1E), que foram colocados em placas de cultivo celular (*Corning Incorp.*, NY) de 6 poços,

estéreis, contendo meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com glutamina 4 mM, piruvato 1 mM, aminoácidos não-essenciais 1 mM, bicarbonato de sódio 2,9 mM e 15% de soro fetal bovino (Invitrogen – USA) e

incubados a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Foi acrescentado ao orifício central do explante, local a ser inoculado com *B. abortus*, o meio RPMI 1640 enriquecido como descrito anteriormente.

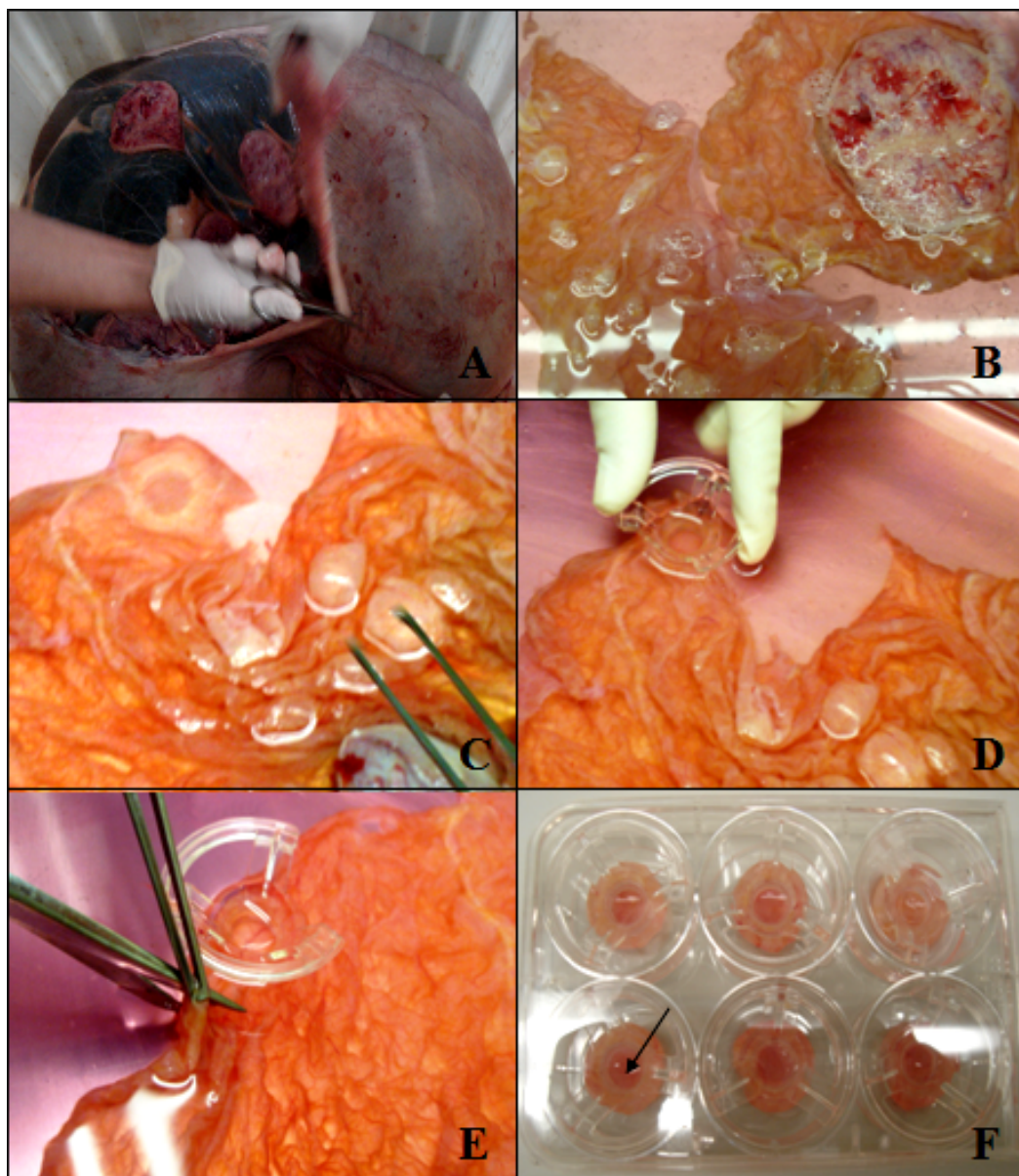


Figura 1. Ilustração da abertura do útero e confecção dos explantes da membrana corio-alantóideia. (A) Abertura do útero; (B) Membrana cório-alantóideia; (C) Posicionamento do anel de crescimento sob a região intercotiledonária da membrana cório-alantóideia; (D) Posicionamento dos suportes destacáveis e estéreis dos explantes sobre a membrana cório-alantóideia e encaixe com anel de crescimento (E) Individualização dos explantes da membrana cório-alantóideia; (F) Placa de cultivo celular de 6 poços contendo os explantes da membrana cório-alantóideia. Seta: espaço central da membrana de crescimento do inserto onde foi feita a inoculação.

5.5 - Inoculação dos explantes

Os explantes confeccionados foram divididos em grupo controle e grupo infectado, ambos avaliados em quatro tempos (0,5, 2, 4 e 8 h pós-infecção). Cada placa representando um tempo analisado continha três replicatas de explantes do grupo controle (não infectado) e três replicatas do grupo infectado com *B. abortus* 2308.

Para infecção experimental foi usada a amostra de referência 2308 de *B. abortus* cultivada conforme descrito no item 5.3. Os explantes de membrana cório-alantóidea foram inoculados no espaço central de cada membrana de crescimento do explante (Figura 1 F) com 200 µL de meio de cultura (RPMI 1640), contendo $1,0 \times 10^8$ bactérias que correspondem a uma multiplicidade de infecção de 1000, ou seja, 1000 bactérias/célula tropoblástica (Carvalho-Neta *et al.*, 2008). A seguir, as placas contendo os explantes foram centrifugadas por 15 minutos a 1000 xg e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por trinta minutos para a internalização das bactérias. Após o tempo de incubação, retirou-se o inóculo de cada explante substituindo-o por meio RPMI 1640 suplementado com 50 µg de gentamicina/mL (Invitrogen – USA) para eliminação de bactérias extracelulares. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂ por 1 h e após esse tempo os explantes foram lavados três vezes com meio RPMI 1640 para eliminação de resíduos do antibiótico. Após a lavagem, foi acrescentado meio RPMI 1640 enriquecido e novamente as placas foram incubadas a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Nesse ensaio foram analisados os tempos de 0,5 h, 2 h, 4 h e 8 h após infecção, cada grupo em triplicatas, iniciando a contagem de tempo após a retirada do meio RPMI 1640 suplementado com gentamicina. Os explantes do grupo controle foram inoculados com meio RPMI 1640

enriquecido estéril e mantidos nas mesmas condições indicadas anteriormente.

5.6 - Bacteriologia

Para determinar o número de bactérias internalizadas em cada explante foram destinados à bacteriologia três explantes de cada grupo (controle e infectado). Após a retirada do meio de cultura RPMI com gentamicina, os explantes foram lavados duas vezes em PBS (*Phosphate buffered saline* - pH 7,4) e em seguida, lisados com 200 µL de Triton X-100 (Roche, Germany) estéril a 0,1%. Do homogeneizado obtido foram feitas diluições seriadas na base 10 em PBS (pH 7,4) e o número de bactérias foi determinado pelo “*drop count method*” (Miles e Misra, 1938). As placas de ágar triptose (Difco, EUA) foram semeadas com 25 µL de cada diluição, em um total de 7 diluições por placa. Após 48 h de incubação das placas a 37°C com 5% de CO₂ foi feita a contagem das colônias e o número de bactérias foi obtido pela média das triplicatas.

5.7 - Extração de proteínas do epitélio trofoblástico dos explantes de membrana cório-alantóidea de bovinos

Após cada tempo de infecção (0,5, 2, 4 e 8 h) o meio de cultura foi completamente retirado dos explantes de membrana cório-alantóidea que foram lavados com meio RPMI 1640 sem bicarbonato e sem SFB. Esse procedimento foi repetido três vezes. A seguir foi acrescentado à superfície do explante correspondente ao epitélio trofoblástico 200 µL de tampão de lise e mix de inibição de proteases. As placas foram mantidas sob agitação (50 rpm) por 30 minutos em agitador orbital para placas (KS 250 basic – IKA Labortechnik – Alemanha). Após esse tempo, fez-se a homogeneização do tampão de lise de forma a retirar todas as células presentes na

superfície dos explantes. A seguir, o lisado celular foi transferido para tubos de microcentrífuga que foram deixados sob agitação lenta (50 rpm) por duas horas em agitador orbital para placas. Após esse período, os extratos de proteínas foram passados através agulha (26G) para completar a lise celular e então, centrifugados por 30 minutos a 20.000 xg. O sobrenadante foi recolhido e dividido em alíquotas de 30 µL que foram mantidas a -80°C.

5.8 - Dosagem de proteínas

Foram usados o método de Bradford modificado (Neuhoff *et al.*, 1988) e o kit 2D Quant (GE Healthcare, Inglaterra) para quantificação de proteínas presentes nos lisados celulares.

5.9 - Análise Proteômica

O estudo proteômico foi realizado no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia/Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

5.9.1 - Eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE)

Para verificar a qualidade das proteínas extraídas e confirmar os valores obtidos na dosagem de proteínas foi feita a eletroforese das amostras em gel SDS/PAGE. Para isso, 10 µL de tampão desnaturante foi adicionado em 20 µg de cada amostra que foi incubada em banho-maria a 100°C por 5 minutos para desnaturação das proteínas. As amostras foram aplicadas em gel de poli(acrilamida) 12 % (Mix acrilamida 30% [acrilamida 29% e 1% N,N-metileno-bis-acrilamida], Tris 1,5 M pH 8,8, Dodecil Sulfato de Sódio 10%, Persulfato de Amônio 10%, TEMED) (GE Healthcare, Inglaterra) com gel de empilhamento a 4 % (Mix acrilamida 30% [acrilamida 29% e 1% N,N-metileno-bis-acrilamida], Tris 1,0 M pH 6,8,

Dodecil Sulfato de Sódio 10%, Persulfato de Amônio 10%, TEMED) (GE Healthcare, Inglaterra), juntamente com padrão de peso molecular *BenchMark® Protein Lader* (Invitrogen, EUA) e a eletroforese foi realizada por 1 h nas seguintes condições: 100 V, 102 mM e 120 W.

Após a eletroforese, os géis foram corados pela solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250*/Thermo Scientific-USA, 25% metanol/Merck-Alemanha, 5% ácido acético/Merck-Alemanha) por 1 h e a solução descorante contendo ácido acético (5%) e metanol (10%) foi usada para visualização das bandas coradas.

5.9.2 - Gel bidimensional (2DE)

A confecção do gel bidimensional é dividida em duas partes: focalização isoeétrica onde as proteínas são separadas de acordo com o ponto isoeétrico (pI), seguido por SDS-PAGE, método que separa as proteínas pela massa molecular.

5.9.2.1 - Focalização isoeétrica (primeira dimensão)

Para a focalização isoeétrica das amostras de proteínas testadas, foram usadas tiras IPG (tiras de gel de poli(acrilamida) com gradiente de pH imobilizado) de 7 cm e pH 4 a 7, (GE Healthcare, Inglaterra). Em 50 µg das amostras de proteínas extraídas foi adicionada a solução de reidratação contendo 1,25 µL de tampão IPG (pH 4-7) (10 µL/mL) (GE Healthcare, Inglaterra) e tampão IEF (Isoeletrofocalização) (8 M de uréia, 2 M de tiuréia, CHAPS 4%, azul de bromofenol 0,0025%, 10 mg/mL de ditiotretol - GE Healthcare, Inglaterra) em um volume total por tira de 125 µL. Após homogeneização da mistura, as amostras foram incubadas com as tiras IPG em aparato de reidratação (*Immobiline Dry*

Strip Reswelling Tray, GE Healthcare, Inglaterra) durante aproximadamente 12 h e submetidas à focalização isoeletrica usando o sistema Ettan™ IPGphor™ 3 IEF (GE Healthcare, Inglaterra) e o programa *IPGphor* (GE Healthcare, Inglaterra) com os seguintes passos:

Passo	Voltagem	Tempo/Vh
1	300 V	4:00 h
2	1000 V	300 Vhr
3	5000 V	4000 Vhr
4	5000 V	1250 Vhr
5	500 V	1:00 h
6	500 V	30:00 h (Hold)

5.9.2.2 - SDS - PAGE (segunda dimensão)

Após a focalização, a segunda dimensão foi realizada em aparato de eletroforese vertical (Ettan DALTsix *Electrophoresis Unit* – GE Healthcare, Inglaterra). As tiras IPG foram colocadas em 5 mL de solução de equilíbrio contendo 6 M de uréia (GE Healthcare, Inglaterra), 50 mM de Tris [1,5 M] / HCl pH 8,8 (Promega, USA), 30% v/v de glicerol (Merck, Alemanha), 2% w/v de dodecil sulfato de sódio (Invitrogen, USA), 0,001% v/v de solução de azul de bromofenol a 0,5%, na qual foi acrescentado 10 mg/mL de ditiotreitrol (DTT - GE Healthcare, Inglaterra), no momento do uso. As tiras foram mantidas nessa solução por 15 minutos e logo a seguir, colocadas em solução de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodocetamida (GE Healthcare, Inglaterra) por mais 15 minutos. As tiras IPG foram colocadas sobre um gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (dodecil sulfato de sódio, Invitrogen, EUA). Para a imobilização das tiras foi acrescentada uma solução de agarose (Invitrogen, EUA) a 0,5% contendo 0,002% de azul de bromofenol. Foi usado o marcador de massa molecular *BenchMark*®

Protein Lader (Invitrogen, EUA) e a eletroforese realizada a 30 mA por gel.

Para a coloração dos géis foi usado o corante de *Comassie Brilliant blue* coloidal G-250 (GE Healthcare, Inglaterra), segundo protocolo de Candiano *et al.* (2004). Após coloração os géis foram digitalizados utilizando o *scanner ImageScanner* (Amersham Biosciences, Inglaterra).

5.9.3 - Análise das imagens dos géis

As imagens foram analisadas no programa *ImageMaster*™ 2D *Platinum* (versão 6.0, GE Healthcare, Inglaterra) por uma combinação de detecção automática dos *spots*, feita pelo programa e detecção manual. Possíveis alterações de intensidade do gel, como por exemplo, manchas ou precipitação de corante podem ser detectadas. Esse fato pode provocar a detecção de *spots* que não são proteínas provocando erros na análise. Por outro lado, *spots* com intensidade baixa podem não ser detectados. Por esse motivo foi feita, após a detecção automática, a edição manual de forma a corrigir detecções errôneas ou ausentes.

Para determinar a reprodutibilidade do experimento, os géis foram feitos em triplicata. Uma vez os *spots* detectados, o programa automaticamente computa a quantidade de proteína presente em cada um deles. O programa *ImageMaster* adicionalmente calcula a intensidade relativa (% intensidade: calibração da intensidade do *spot* “S” no gel contendo n *spots*) e o volume relativo (% volume: volume do *spot* “S” no gel contendo n *spots*) normalizados para cada *spot* e que são relativamente independentes das variações entre géis particularmente causadas por possíveis diferenças nas condições experimentais.

Pela definição:

% Intensidade:

$$\%Intensity = \frac{Intensity}{\sum_{S=1}^n Intensity_S} \times 100$$

% Volume:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n Vol_S} \times 100$$

O programa também calculou os pontos isoelétricos, as massas moleculares e a quantidade relativa de cada *spot*. Para a determinação da quantidade relativa de cada *spot* foi usado o método de normalização do volume. Com as médias dos volumes de cada *spot* calculadas pelo programa e considerando *spots* que apresentaram mudanças de duas vezes ou maiores (aumento ou diminuição), foi feito o teste t de *Student* (Sampaio, 1995) e consideradas alterações significativas valores de $P \leq 0.05$. As análises determinaram quais os tempos seriam avaliados pelo método de eletroforese diferencial em gel (DIGE - *Difference Gel Electrophoresis*). A Figura 2 mostra um esquema representando as análises realizadas.

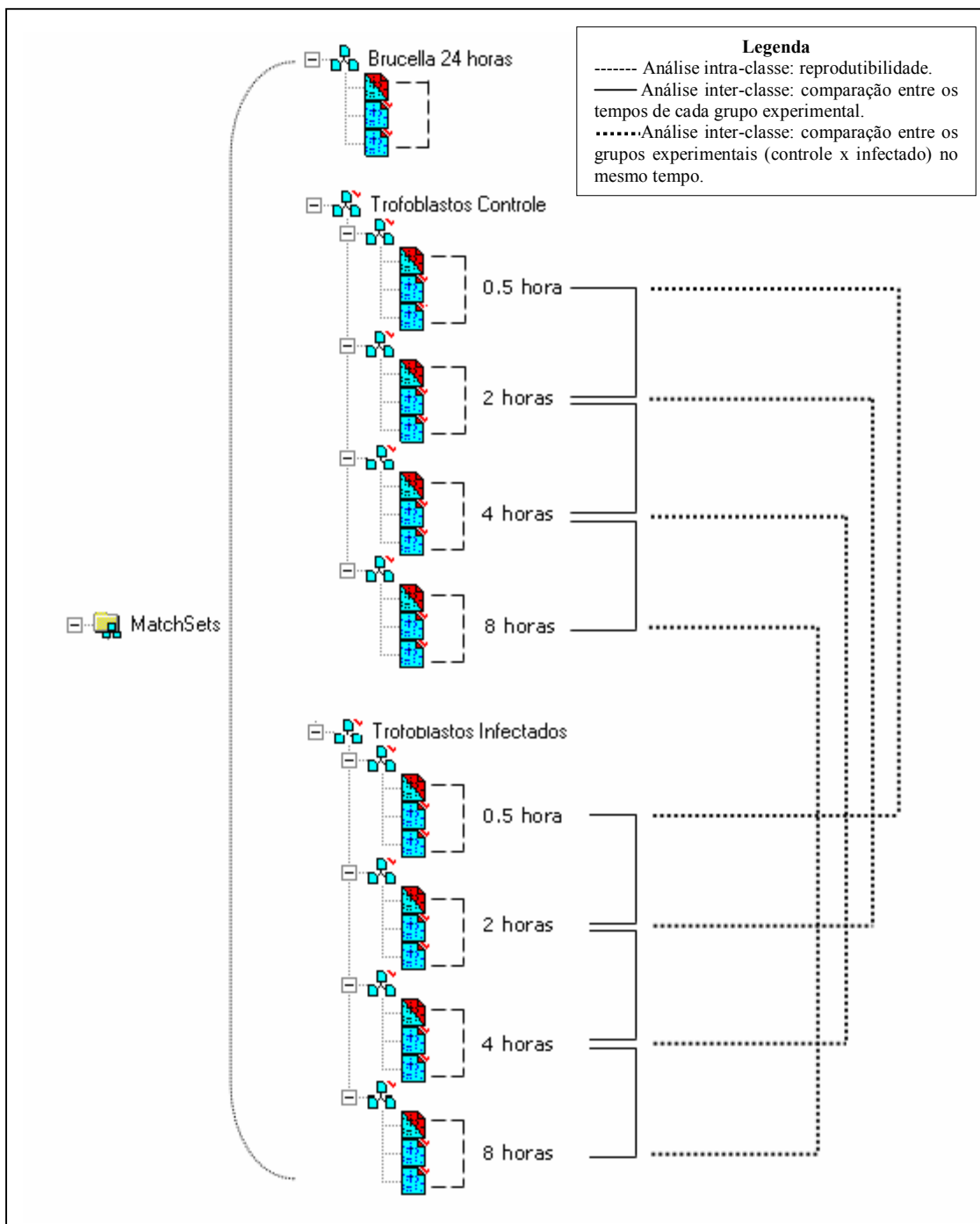


Figura 2. Esquema das análises das imagens dos géis 2DE de amostras de *Brucella abortus* e de células trofoblásticas bovinas não infectadas e infectadas por *Brucella abortus*.

5.9.4 - Eletroforese diferencial em gel (DIGE - *Difference Gel Electrophoresis*)

Após a determinação dos tempos em que foi observada maior alteração do perfil proteico das células trofoblásticas após infecção por *B. abortus*, foi realizada a análise diferencial pelo método DIGE. O delineamento do experimento foi feito de forma a ocorrer inversão dos corantes (*dye swap*) usados em cada amostra com o objetivo de eliminar possíveis vieses no resultado provocados pela diferença de intensidade dos corantes usados. Um terceiro corante foi usado para marcar a mistura de uma fração de proteínas de todos os grupos experimentais (padrão interno da reação). Nesse ensaio foi usada uma mistura equitativa de proteínas dos explantes confeccionados a partir das membranas cório-alantóideas de três fetos coletados.

As amostras de proteínas mantidas a -80°C foram descongeladas e o pH de cada uma delas medido e se necessário, ajustado para 8,5 com NaOH 500 mM ou HCl 0,5 mM. A cada 50 μg de proteína foi adicionado 400 pmol do corante Cy2, Cy3 ou Cy5 (GE Healthcare, Inglaterra) e a seguir, as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas rapidamente e mantidas em banho de gelo por 30 minutos. Foi acrescentado 1 μL de L-lisina 10 mM para parar a marcação e depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas e colocadas no gelo por 10 minutos. As amostras marcadas foram misturadas e a elas adicionados 3,5 μL de tampão IPG (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e tampão IEF (8 M de uréia, 2 M de tiuréia, 4% w/v de CHAPS, 0,0025% v/v de solução de azul de bromofenol a 0,5%, 10 mg/mL de Ditioeritritol – GE Healthcare, Inglaterra) suficiente para completar 350 μL .

Após homogeneização da mistura, as amostras foram incubadas com as tiras com anfólitos de pH variando de 4 a 7, (IPG strips de 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) em aparato de reidratação (*Immobiline Dry Strip ReswellingTray*, GE Healthcare, Inglaterra) durante aproximadamente 12 h e submetidas a focalização isoeletrica no sistema Ettan™ IPGphor™ 3 IEF (GE Healthcare, Inglaterra) e o programa IPGphor (GE Healthcare, Inglaterra) com os seguintes passos:

Passo	Voltagem	Tempo/Vh
1	500 V	4:00 h
2	1000 V	800 Vhr
3	10000 V	16500 Vhr
4	10000 V	13700 Vhr
5	500 V	1:00 h
6	500 V	30:00 h (Hold)

Após a focalização, a separação de segunda dimensão foi feita conforme descrito anteriormente. Imediatamente após a eletroforese, os géis foram digitalizados usando *Typhoon Trio* (GE Healthcare, Inglaterra) com excitação/emissão de comprimentos de onda específicos para Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) e Cy5 (633/670 nm).

5.9.5 - Análise dos géis fluorescentes

A análise das imagens foi feita usando o programa DeCyder™ 2-D *Differential Analysis Software* v7.0 (GE Healthcare, Inglaterra) de acordo com o manual do fabricante.

Os *spots* contendo proteínas marcadas com os diferentes corantes fluorescentes foram co-detectados e quantificados nas três imagens obtidas de cada gel. O modo DIA (*Differential In-gel Analysis*) detectou automaticamente os *spots* a partir da imagem derivada da sobreposição de

imagens individuais e essa co-deteção permitiu que todos os *spots* fossem representados em todas as imagens obtidas. Também quantificou a abundância de proteína dos *spots* de cada gel individual pela comparação da razão de volume normalizado de cada *spot* das amostras marcadas pelos corantes Cy3 e Cy5. As imagens dos padrões internos (fração de proteínas de todos os grupos experimentais marcada pelo Cy2) também foram analisadas pelo modo DIA e os dados de cada *spot* foram usados para comparar quantitativamente géis diferentes de forma acurada.

O modo BVA (*Biological Variation Analysis*) executou o processamento das imagens usando os arquivos gerados pelo modo DIA juntamente com os arquivos das imagens originais. Foi feito o *Match* entre as imagens que identificou proteínas comuns entre os diferentes géis. O modo BVA também realizou o cálculo da abundância média para cada *spot* entre os géis DIGE obtidos nesse estudo.

As análises estatísticas foram feitas pelo modo EDA (*Extended Data Analysis*). Baseado na razão média do volume normalizado, *spots* que apresentaram mudanças de duas vezes ou maiores (aumento ou diminuição) foram avaliados quanto à significância estatística da alteração na abundância. Para isso foram realizados o teste t de *Student* e análise de variância (ANOVA) sendo considerados significativos valores de $P \leq 0,05$. *Spots* com alterações significativas foram selecionados para identificação por espectrometria de massa.

Além disso, foi verificada a presença de *spots* em apenas um grupo experimental (diferenças qualitativas). Estes também foram selecionados para identificação por espectrometria de massa.

5.9.6 - Proteólise *in gel* e preparação das amostras para espectrometria de massa (MS)

Para retirada dos *spots* selecionados, novos géis bidimensionais foram confeccionados conforme já descrito. Após eletroforese, os géis foram corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Thermo Scientific, USA) e digitalizados para marcação dos *spots* de interesse. Os *spots* diferencialmente expressos (diferenças quantitativa e qualitativa) foram cortados em pequenos pedaços de aproximadamente 1,0 mm x 1,0 mm x 1,0 mm usando bisturi estéril. Foi feita a descoloração do gel com 400 μ L da solução contendo 25 mM de bicarbonato de amônio (NH_4CO_3) pH 8,0 (Synth, Brasil) e 50% de acetonitrila (Sigma-Aldrich, USA). O processo foi repetido por 3 vezes durante 15 minutos em temperatura ambiente e sob agitação vigorosa. Após esta etapa, o descorante foi removido e os fragmentos de géis foram então desidratados com 200 μ L de acetonitrila por 5 minutos. Após serem secos em microcentrífuga com vácuo, os *spots* foram reidratados e as proteínas digeridas usando 20 μ L da solução contendo 2,0 mM de bicarbonato de amônio (NH_4CO_3) (Synth, Brasil) e tripsina (Promega, EUA) a 20 ng/ μ L, incubando por 16-24 h à 37°C. Para extração dos peptídeos o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e 30 μ L da solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila a 50% foi acrescentada ao gel e deixada por 30 minutos sob agitação constante. Após esse tempo, a solução foi removida para o tubo contendo o primeiro sobrenadante. O procedimento anterior foi repetido e todos os extratos foram colocados no mesmo microtubo. A seguir, os extratos foram concentrados (volume final 10 μ L) em colunas ZipTip® C18 (Millipore, USA). O volume foi reduzido para 5,0 μ L em microcentrífuga com vácuo.

5.9.7 - Análise de Espectrometria de Massa (MS)

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Para análise das amostras no espectrômetro de massa 0,3 µL da solução da amostra foi misturado ao mesmo volume da solução matriz saturada [10 mg/mL R-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% acetoneitrila/0,1% ácido trifluoroacético] (Sigma-Aldrich, USA) na placa. Dados brutos para a identificação de proteínas foram obtidos no analisador proteômica AB SCIEX MALDI TOF/TOF™ 5800 *System* (Applied Biosystems, USA). A calibração externa do modo MS foi realizada usando uma mistura de quatro peptídeos: des-Arg1-bradicinina ($m/z = 904.468$); angiotensina I ($m/z = 1296.685$); Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z = 1570.677$) e hormônio adenocorticotrópico (18-39) ($m/z = 2465.199$). Os espectros MS/MS foram calibrados externamente usando massas de íons fragmento conhecidos observadas no espectro MS/MS da angiotensina I. Após a aquisição de dados, uma lista de picos foi obtida a partir dos dados brutos do MS/MS usando a função *Peaks to Mascot* do programa *4000 Series Explore* (Applied Biosystems, USA).

5.9.8 - Identificação das proteínas em banco de dados

Toda a informação adquirida para cada *spot*, ou seja, as relações massa/carga e intensidade dos picos obtidos no espectro bem como as razões massa/carga e intensidades dos picos referentes a cada um dos cinco espectros de MS/MS foi compilada em um arquivo texto. Esse arquivo foi usado pelo MASCOT (Matrix Science, EUA)

(<http://www.matrixscience.com>), para realizar a busca nos bancos de dados. Uma vez concluída a busca de acordo com a sistemática do programa, o MASCOT informa o resultado usando para isso um gráfico de barras no qual existe um valor tido como limite. Escores abaixo deste valor indicam eventos randômicos, ou seja, sem valor estatístico. Por outro lado, se o escore atribuído para uma determinada proteína exceder o valor limite a chance de identificação gerada ser um evento randômico é de 5% e quanto maior esse valor maior a probabilidade da identificação estar correta. Os parâmetros usados para a busca foram os seguintes: sem restrição para peso molecular da proteína, um sítio de clivagem da tripsina perdido, modificações variáveis da metionina (oxidação) e da cisteína (carbamidometilação), formação de piroglutamato na extremidade N-terminal da glutamina sem outras modificações pós-traducionais. A tolerância de massa para os peptídeos nas buscas foi de 0,8 Da para espectros MS e 0,6 Da para espectros MS/MS. Para a busca, foram usados os bancos de dados de *Bos taurus* e *Brucella abortus* depositados no NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, EUA).

5.9.9 - Estudo da predição de interação entre as proteínas identificadas

Para identificar as possíveis interações existentes entre as proteínas identificadas e para tentar compreender melhor os prováveis mecanismos relacionados à produção dessas proteínas nas condições estudadas, foi feito o estudo da predição de interação.

Para isso, foi usado o programa *String* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) versão 9.0 – *Functional Protein Association Networks* (<http://string->

db.org) que é um banco de dados de interações conhecidas e preditas entre proteínas. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais), que são derivadas de quatro fontes: contexto genômico, experimentais, co-expressão e conhecimentos prévios.

Nessa análise foram incluídas as proteínas identificadas apenas em amostras de células trofoblásticas infectadas. Foi usado o modo *Evidence* e grau de confiança médio de 0,400. Os parâmetros de busca foram: *neighborhood*, *gene fusion*, *co-occurrence*, *co-expression*, *experiments*, *databases* e *textmining*. As cores das linhas indicam o tipo provável de associação entre as proteínas: verde - ativação; vermelho - inibição; azul - ligação; azul claro - fenótipo; roxo - catálise; rosa - modificações pós-traducionais; preto - reação e amarelo - expressão.

6 - RESULTADOS

6.1 - Bacteriologia

Os experimentos de infecção dos explantes permitiram a quantificação, por análise bacteriológica, do número de bactérias internalizadas no epitélio trofoblástico. A Figura 3 mostra o número de bactérias (UFC) internalizadas que foi obtido calculando-se a média de UFC quantificadas em cada um dos três explantes confeccionados a partir de cada uma das quatro membranas cório-alantóideas coletadas para o grupo controle e infectado e que foram lisadas com Triton X-100 (Roche, Germany) estéril a 0,1% após a retirada de gentamicina para eliminação das bactérias extracelulares. Nos explantes controle não houve crescimento bacteriano.

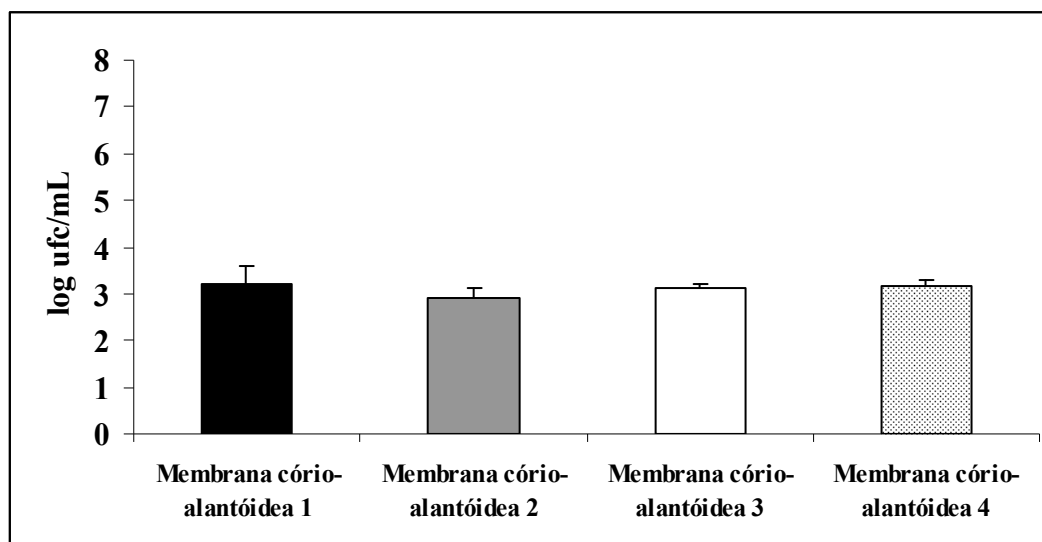


Figura 3. Número de bactérias (log ufc/mL) internalizadas pelas células trofoblásticas dos explantes de membrana cório-alantóidea confeccionados a partir de quatro fetos coletados no terceiro trimestre de gestação. A quantificação foi realizada usando o “*drop count method*” (Miles e Misra, 1938) e o número de UFC foi transformado logaritmicamente.

6.2 - Obtenção das amostras de proteínas e gel SDS/PAGE

Foram obtidas amostras de proteínas dos explantes de membrana cório-alantóideia infectados ou não e em todos os tempos de infecção (0,5, 2, 4 e 8 h). As amostras de proteínas foram dosadas pelo método de Bradford modificado (Neuhoff *et al.*,

1998) e pelo kit 2D Quant (GE Healthcare, Inglaterra). A concentração de proteínas foi definida pela média dos valores obtidos nos dois métodos de dosagem usados. Os géis SDS/PAGE confirmaram os valores encontrados pela dosagem e demonstraram que as amostras tinham qualidade para serem usadas nos procedimentos subsequentes (Figura 4).

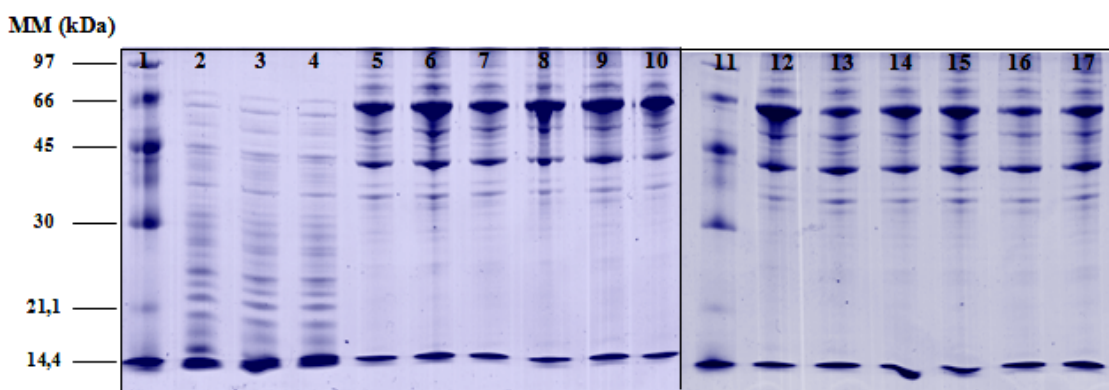


Figura 4. Géis SDS/PAGE a 12% de amostras de proteínas extraídas (20 µg) de explantes de membrana cório-alantóideia de bovinos infectados e não infectados por *B. abortus* 2308 corados por *Coomassie Brilliant blue* 250 R. Canaletas 1 e 11: padrão massa molecular (Da) (BenchMark® *Protein Lader* - Invitrogen, EUA); Canaletas 2, 3 e 4 - *Brucella abortus* 2308; Canaletas 5, 6 e 7 - Triplicatas trofoblastos controle 0,5 h; Canaletas 9, 10 e 11 - Triplicatas trofoblastos infectados 0,5 h; Canaletas 12, 13 e 14 - Triplicatas trofoblastos controle 4 h; Canaletas 15, 16 e 17 - Triplicatas trofoblastos infectados 4 h.

6.3 - Determinação do perfil proteico de *Brucella abortus* 2308 (cultivo por 15 ou por 24 h) para ser usado na análise diferencial

Para determinar o perfil de expressão proteico que seria usado na análise de expressão diferencial de proteínas (perfil com maior número de *spots*) foram comparados os perfis proteômicos da

amostra *B. abortus* 2308 cultivada por 15 h e por 24 h, que representam respectivamente, fase logarítmica e fase estacionária de crescimento.

A Figura 5 mostra as imagens dos géis 2DE dos perfis proteicos da amostra de referência *B. abortus* 2308 cultivada por 15 e 24 h. Para cada tempo de cultivo foram feitas três culturas independentes.

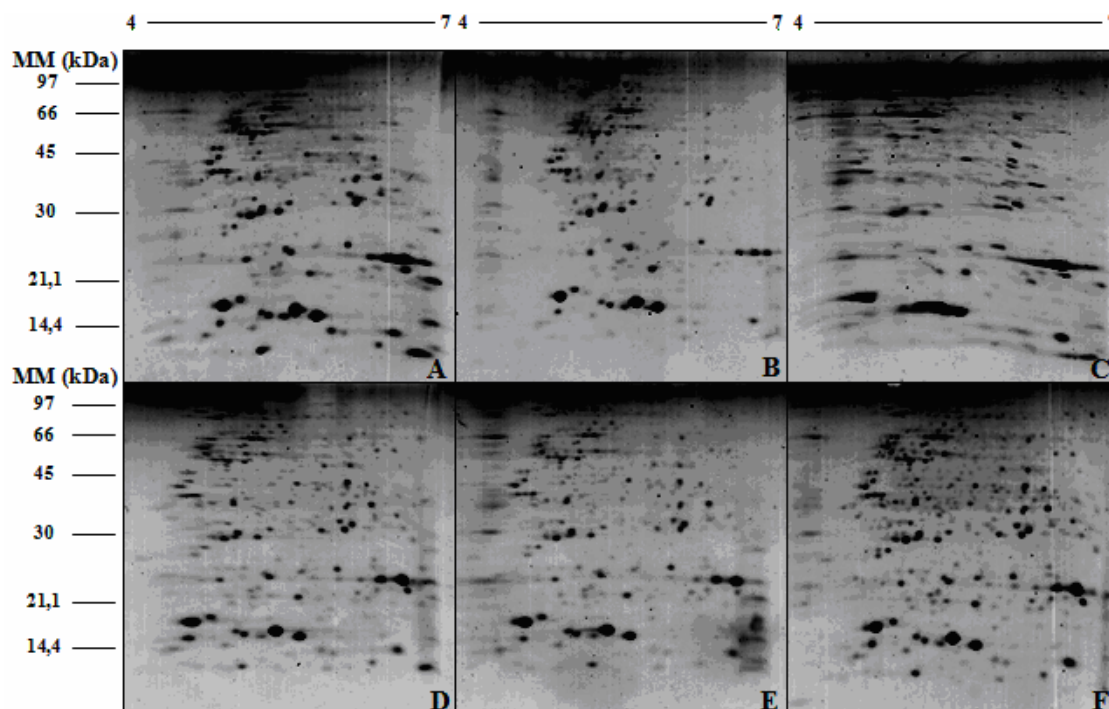


Figura 5. Géis 2DE 12% corados por *Coomassie Brilliant blue* G-250 (IPG pH 4 a 7, 7cm GE Healthcare, Inglaterra). (A), (B) e (C) Triplicatas das amostras de proteínas extraídas de *Brucella abortus* 2308 cultivadas por 15 h (culturas independentes) (50 µg); (D), (E) e (F) Triplicatas das amostras de proteínas extraídas de *B. abortus* 2308 cultivadas por 24 h (culturas independentes) (50 µg).

As imagens mostram que os perfis proteômicos são bastante semelhantes entre as amostras cultivadas por 15 h e 24 h. Por outro lado, o número de *spots* detectados nos géis 2DE das triplicatas das amostras de proteínas de *B. abortus* cultivadas por 15 h foi menor que o número de *spots* detectados

nos géis das triplicatas de proteínas de *B. abortus* cultivadas por 24 h (Tabela 1). Por esse motivo foram usadas nas análises de reprodutibilidade e na análise diferencial de expressão de proteínas as amostras de *B. abortus* cultivadas por 24 h.

Tabela 1. Número de *spots* detectados nas triplicatas dos géis bidimensionais de *Brucella abortus* cultivada por 15 h e 24 h.

<i>B. abortus</i> 2308	Triplicatas	Número de <i>spots</i> detectados
Cultivo por 15 h	1	218
	2	205
	3	253
Cultivo por 24 h	1	325
	2	329
	3	377

Para avaliar a reprodutibilidade dos géis de *B. abortus* cultivadas por 24 h foram analisados o número e percentagem de *spots* comuns detectados entre as triplicatas (*Match*) e construídos gráficos de dispersão (*Scatter plot*).

Na Tabela 2 são mostrados o número e a percentagem de *spots* comuns (*Match*) em relação ao gel *Master*, o gel com maior número de *spots*.

Tabela 2. Número de *spots* comuns (*Match*) detectados nas triplicatas dos géis bidimensionais de *B. abortus*.

Amostra	Triplicatas	Número de <i>Spots</i>	Gel <i>Master</i>	Número de <i>Match</i>	% de <i>Match</i>
<i>B. abortus</i>	1	325	-	319	90,8832
2308	2	377	x	377	-
	3	329	-	322	91,2181

Os géis são considerados reprodutíveis ao apresentarem percentagem de *Match* acima de 80%. Nesse experimento foi obtida percentagem de *Match* acima de 90%, demonstrando reprodutibilidade entre as triplicatas obtidas de culturas independentes de *B. abortus* 2308.

Foi construído o gráfico de dispersão para avaliar a correlação de intensidade entre as triplicatas e verificar existência de variações experimentais relacionadas à quantidade de corante e de proteínas (Figura 6).

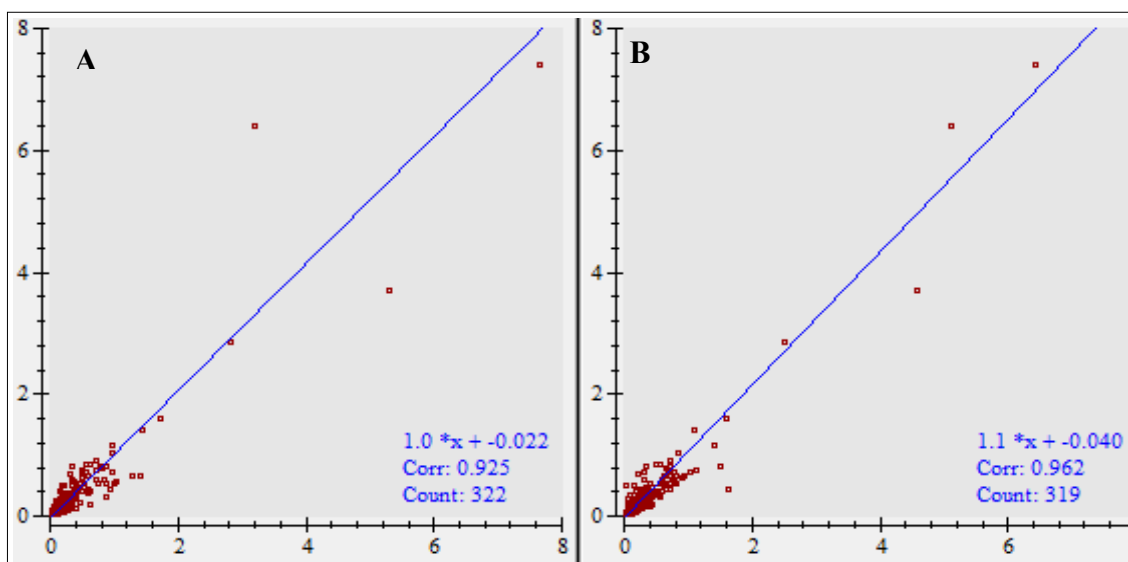


Figura 6. Diagrama de dispersão comparando as intensidades dos *spots* entre as triplicatas dos perfis de proteínas de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h. A) Comparação entre intensidades dos *spots* obtidas no gel *Master* (triplicata 2 – Tabela 2) e a triplicata 1. Índice de correlação: 0,925. B) Comparação entre intensidades dos *spots* obtidas no gel *Master* (triplicata 2 – Tabela 2) e a triplicata 3. Índice de correlação: 0,962.

Comparando os géis obtidos das triplicatas das amostras de *B. abortus* 2308 cultivada por 24 horas foram obtidos índices de correlação acima de 0,92 (Figura 6). São considerados aceitáveis índices com valores acima de 0,75 que indicam perfis e intensidade de *spots* semelhantes entre os géis comparados. Isso demonstra que a variação experimental relacionada à quantidade de corante e de proteínas usadas no ensaio foi baixa (Görg *et al.*, 2004).

6.4 - Obtenção do perfil de expressão de proteínas de células trofoblásticas bovinas não infectadas e infectadas por *Brucella abortus* 2308 e análise de reprodutibilidade entre os géis

Foram obtidas membranas cório-alantóideas de quatro úteros de bovinos intactos no último trimestre de gestação coletados em frigoríficos. Os extratos proteicos obtidos de explantes de membrana cório-alantóidea de um dos quatro úteros coletados foram usados para a padronização da técnica.

A partir dos explantes de membrana cório-alantóidea dos três úteros restantes foram confeccionados géis bidimensionais para todos os tempos (0,5h, 2h, 4h e 8h) avaliados nos grupos experimentais controle e infectado.

Para verificar se os perfis de expressão de proteínas eram suficientemente semelhantes entre as três membranas cório-alantóideas para serem usadas nos experimentos subsequentes ou se haveria necessidade de coletar maior número de úteros, foram feitas as análises de reprodutibilidade entre as triplicatas dos géis confeccionados a partir do material obtido de cada útero.

Na Tabela 3 são mostrados os número e a média de *spots* detectados nos géis das triplicatas de cada tempo e grupo experimental avaliado. Além disso, são mostrados o número e a porcentagem de *spots* comuns (*Match*) entre as triplicatas de cada tempo em relação ao gel *Master* (gel com maior número de *spots* entre as triplicatas).

Tabela 3. Número de *spots* detectados e número/porcentagem de *spots* comuns (*Match*) entre as triplicatas dos géis bidimensionais de células trofoblásticas bovinas não infectadas e infectadas por *Brucella. abortus*

Grupos Experimentais	Tempo	Membrana cório-alantóidea	Numero de <i>Spots</i> detectados	Gel <i>Master</i>	Número de <i>Match</i>	% de <i>Match</i>
Controle	0,5 h	1	70		70	90,9091
		2	84	x	-	-
		3	77		75	93,1677
		Média	77			
	2 h	1	91		82	90,6077
		2	90	x	-	-
		3	79		74	87,5740
		Média	86.6			
	4 h	1	90		87	91,0995
		2	101*	x	-	-
		3	74		74	84,5714
		Média	88.3			
8 h	1	69		64	84,2105	
	2	83	x	-	-	
	3	80		74	90,7975	
	Média	77.3				
Infectado	0,5 h	1	190		180	91,3706
		2	204*	x	-	-
		3	182		176	92,8395
		Média	192			
	2 h	1	144		134	88,1579
		2	160	x	-	-
		3	156		150	94,9367
		Média	153.3			
	4 h	1	168		159	90,0850
		2	185	x	-	-
		3	158		155	90,3790
		Média	170.3			
8 h	1	183		179	92,9870	
	2	102	x	-	-	
	3	168		163	88,1081	
	Média	151				

*Géis com o maior número de *spots* quando na comparação entre os quatro tempos dos grupos experimentais controle e infectado

Nesse experimento foi obtida porcentagem de *Match* acima de 84%, indicando reprodutibilidade entre as triplicatas dos géis. Para verificar a ocorrência de variações

experimentais relacionadas à quantidade do extrato proteico adicionado ao gel ou à intensidade do corante, foram construídos gráficos de dispersão (Figuras 7 e 8).

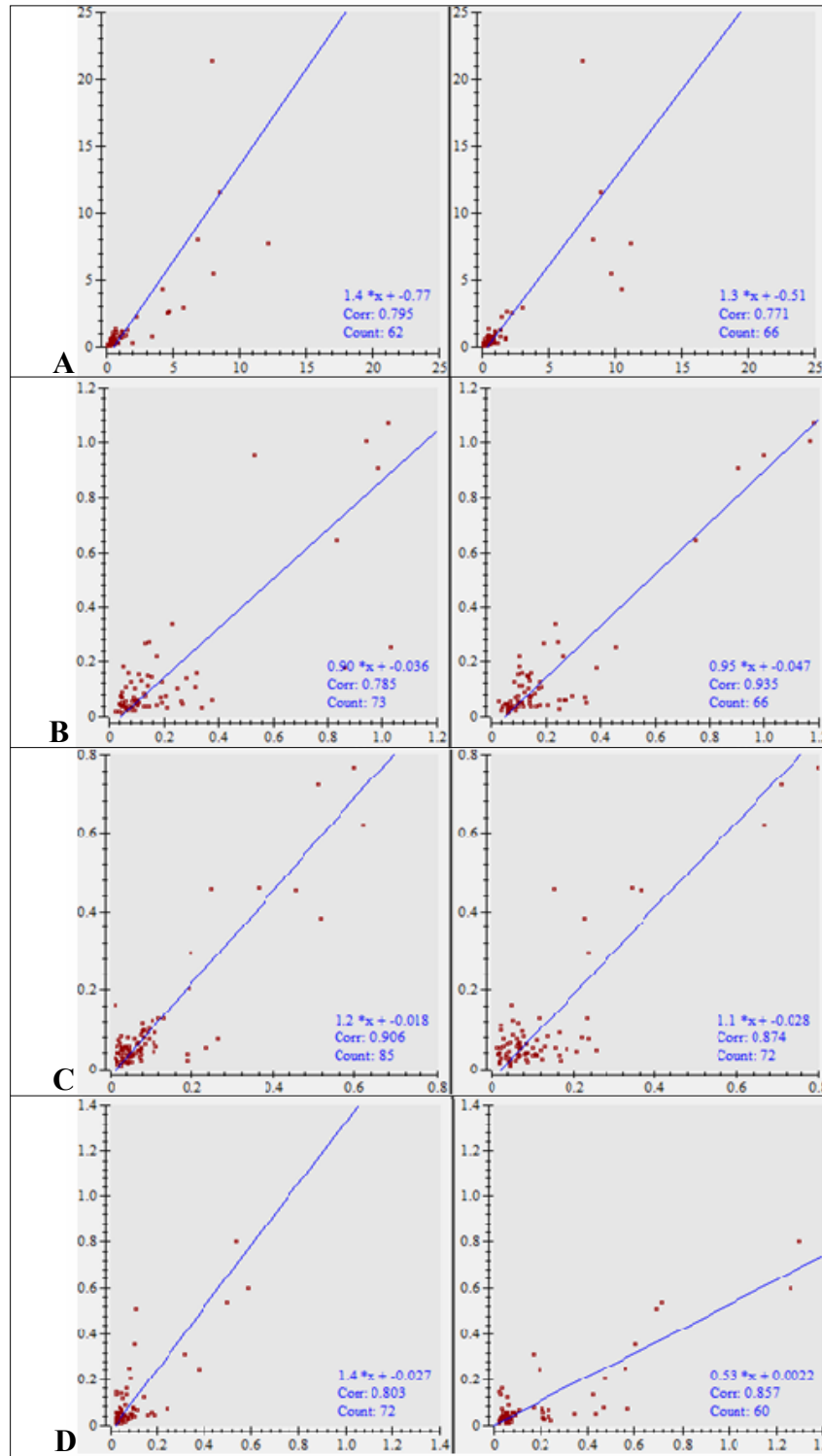


Figura 7. Diagrama de dispersão comparando as intensidades dos *spots* entre as triplicatas dos perfis de proteínas de células trofoblásticas bovinas não infectadas, em relação ao gel *Master*. A) Comparação entre triplicatas tempo 0,5 h – IC: 0,795 e 0,771; B) Comparação entre triplicatas tempo 2 h – IC: 0,785 e 0,935; C) Comparação triplicatas tempo 4 h – IC: 0,906 e 0,874 e D) Comparação triplicatas obtidas tempo 8 h – IC: 0,803 e 0,857.

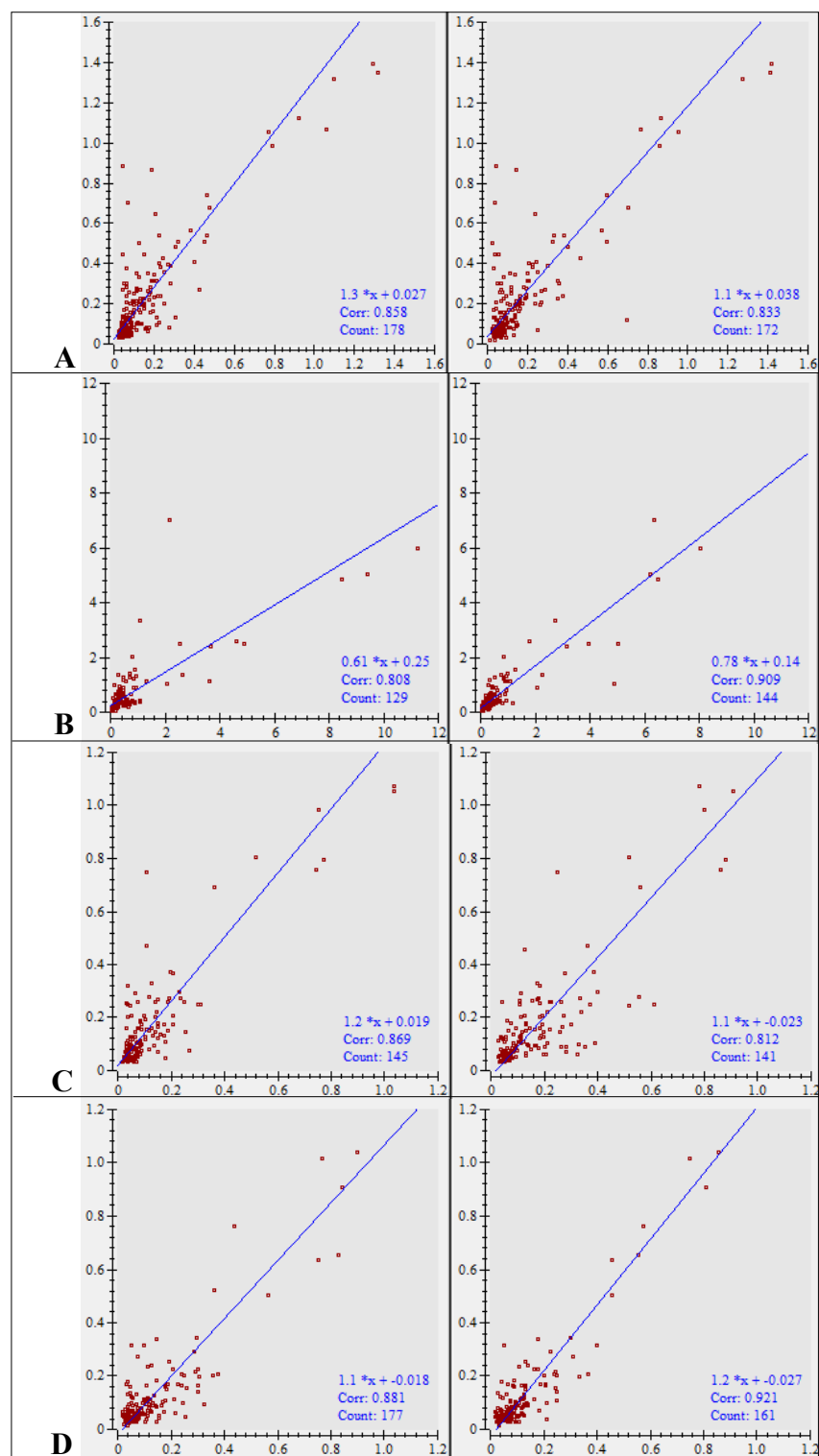


Figura 8. Diagrama de dispersão comparando as intensidades dos *spots* entre as triplicatas dos perfis de proteínas de células trofoblásticas bovinas infectadas, em relação ao gel *Master*. A) Comparação entre triplicatas tempo 0,5 h – IC: 0,858 e 0,833; B) Comparação entre triplicatas tempo 2 h – IC: 0,808 e 0,909; C) Comparação triplicatas tempo 4 h – IC: 0,869 e 0,812 e D) Comparação triplicatas obtidas tempo 8 h – IC: 0,881 e 0,921.

Foram obtidos índices de correlação acima de 0,77 quando comparadas as triplicatas de cada tempo das amostras de células trofoblásticas controle (Figura 7) e acima de 0,80 quando comparadas as triplicatas de cada tempo de células trofoblásticas infectadas (Figura 8). Esse resultado demonstra que os perfis e a intensidade dos *spots* foram semelhantes entre os géis comparados. A variação experimental relacionada à quantidade de corante e de proteínas usadas no ensaio foi aceitável (Görg *et al.*, 2004).

6.5 - Determinação pelo estudo da cinética da infecção de células trofoblásticas por *Brucella abortus* 2308 do tempo a ser usado na análise diferencial usando géis DIGE.

A análise da cinética da infecção de células trofoblásticas por *B. abortus* foi realizada para determinar qual tempo pós-infecção por *B. abortus* 2308 seria usado na análise diferencial pelo DIGE. Foram feitas

comparações dos perfis de expressão de proteínas entre os tempos avaliados em cada grupo experimental (controle e infectados) e entre os mesmos tempos de amostras infectadas e não infectadas.

Entre os tempos do mesmo grupo experimental (controle ou infectados) foram calculadas as porcentagens de *Match* entre os tempos avaliados usando o gel *Master* (gel com maior número de *spots* entre os tempos avaliados) como referência (Tabela 4). A porcentagem de *Match* indica, pelo pareamento dos géis comparados, a porcentagem de *spots* comuns entre os géis.

A Tabela 4 mostra o número de *spots* comuns (*Match*) e a porcentagem de *Match* entre os géis dos tempos avaliados em cada grupo experimental. Os géis referentes ao tempo de 4 h para controle e 0,5 h para infectados foram escolhidos como os géis *Master* por apresentarem o maior número de *spots* (Tabela 3).

Tabela 4. Número de *spots* comuns (*Match*) e porcentagem de *Match* entre as triplicatas dos géis de cada tempo em relação ao gel *Master* do grupo controle e infectado.

Grupo Experimental	Gel <i>Master</i> (tempo)	Tempo Avaliado	Número de <i>Match</i>	% de <i>Match</i>
Controle	4 h	0,5 h	78	84,3243
		2 h	74	77,4869
		8 h	73	79,3478
Infectado	0,5 h	2 h	150	82,4176
		4 h	160	83,7686
		8 h	176	87,2180

Quando comparados os géis dos quatro tempos de amostras de células trofoblásticas controle foi obtida porcentagem de *Match* superior a 77%, o que indica reprodutibilidade alta entre os géis de tempos diferentes e similaridade dos perfis de expressão ao longo do tempo de cultivo dos explantes.

A seguir, os *spots* comuns entre os tempos foram comparados para avaliar se houve alteração significativa das médias de volume dos *spots* entre os tempos avaliados. Não foram identificados *spots* com alteração significativa ($P \geq 0,05$) entre os tempos avaliados.

Desta forma podemos perceber que os perfis de expressão de proteínas de células trofoblásticas não infectadas foram similares nos tempos avaliados. Essa observação é feita a partir da porcentagem alta de *spots* comuns entre os tempos avaliados (% de *Match* > 77%) e também pela não identificação, entre os *spots* comuns, de alteração quantitativa.

Quanto ao perfil de expressão proteica de células trofoblásticas infectadas por *B. abortus* nos quatro tempos avaliados, também foi obtida reprodutibilidade alta entre os géis, com porcentagem de *Match* superior a 82%.

Quando comparados os *spots* correspondentes entre os géis dos quatro tempos avaliados, foram identificados quatro *spots* que apresentaram alteração estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre os tempos avaliados.

Um dos *spots* apresentou aumento significativo do volume no tempo de 2 h em relação ao tempo de 4 h após a infecção (*spot* 1 - Figura 9). Os demais também estavam super-expressos no tempo de 4 h quando comparados ao tempo de 8 h (*spots* 2, 3 e 4 - Figura 9). Esse resultado indica diminuição da expressão no decorrer da infecção. A Figura 9 mostra os *spots* com alteração estatisticamente significativa.

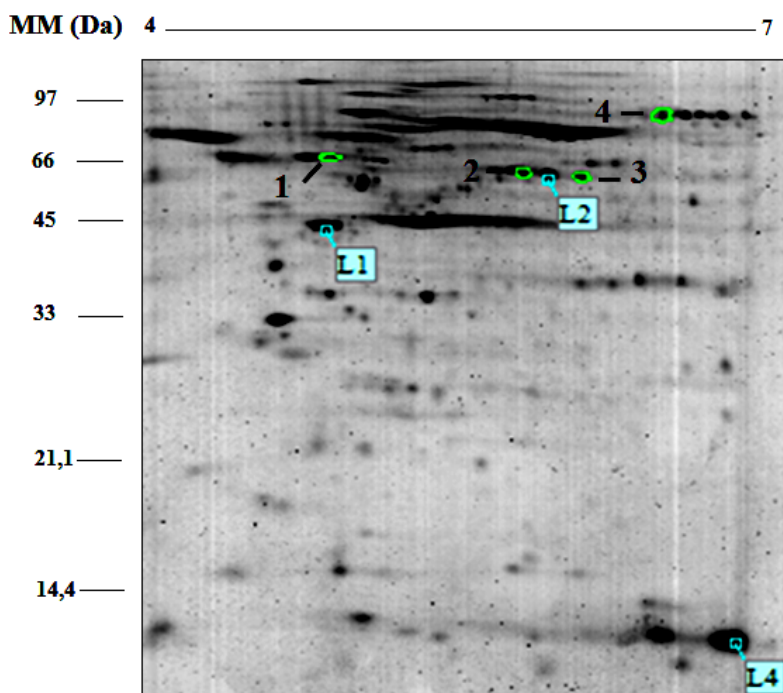


Figura 9. Gel 2DE *Master* obtido a partir de extrato proteico de explantes de membrana cório-alantóidea bovina infectados por *B. abortus* 2308 mostrando o perfil de expressão de proteínas. Os *spots* com diferença significativa da expressão ($P \leq 0,05$) quando comparados os tempos avaliados aparecem circulado em verde. *Spot* 1 - *Spot* super-expresso no tempo de 2 h em relação ao tempo de 4 h ($t = 4,64471$; $P \leq 0,05$); *Spots* 2, 3 e 4 - *Spots* super-expressas no tempo de 4 h após a infecção em relação ao tempo de 8 h ($t = 6,66817$; $t = 4,9594$; $t = 4,71528$; $P \leq 0,05$). L1, L2 e L3 - *Landmarks: spots* usados como referência para comparação entre os géis.

O resultado obtido mostra que o perfil de expressão das células infectadas se manteve bastante semelhante ao longo do tempo estudado. Assim como para as células trofoblásticas não infectadas, foi observada reprodutibilidade alta entre os géis com percentagem de *spots* comuns superior a 82% e entre esses *spots* comuns, quatro apresentaram alteração significativa do volume entre os tempos avaliados.

O último passo para determinação dos tempos que seriam usados na análise diferencial pelo DIGE foi realizado pela análise inter-classe na qual foram comparados os géis de amostras controle e infectadas no mesmo tempo.

Essa análise demonstrou que entre os tempos avaliados, quando comparados os *spots* comuns às duas classes e no mesmo tempo pós-infecção, não foram observadas diferenças quantitativas significativas ($P \geq 0,05$) no volume dos *spots* correspondentes comparados. Por outro lado, diferenças qualitativas entre os géis de amostras controle e infectadas e em todos os tempos avaliados são muito evidentes, sendo o número de *spots* detectados em amostras infectadas muito maior do que o observado em amostras controle (Tabela 3). Diferenças qualitativas se referem à *spots* presentes em apenas um grupo experimental, ou seja, *spot* para o qual não foi detectado *spot* correspondente quando comparados géis de condições experimentais diferentes.

Desta forma, para realização do DIGE foram escolhidos os tempos de 0,5 h e 4 h, tempos que apresentaram o maior número de *spots* e que por isso, foram considerados os géis

Master na comparação entre os perfis dos quatro tempos de células trofoblásticas controle (4 h – Tabela 4) e entre os perfis dos quatro tempos de células trofoblásticas infectadas (0,5 h – Tabela 4).

A obtenção de perfil de expressão de proteínas de *B. abortus* cultivada por 24 h teve como objetivo ajudar na seleção de *spots* que poderiam ser de proteínas expressas pela bactéria durante a infecção e serem identificados nos géis de amostras de células trofoblásticas infectadas pela sobreposição das imagens dos géis.

Contudo, não foi possível comparar as imagens dos perfis obtidos para *B. abortus* cultivada por 24 h com as imagens das amostras de células trofoblásticas infectadas e não infectadas, pois o perfil de expressão proteica é muito diferente entre esses grupos experimentais, tornando impossível a realização do *Match* entre esses grupos, passo exigido para as análises posteriores. Perfis muito diferentes impedem a marcação de *Landmarks* que são *spots* usados como pontos de referência. Esses *spots* devem estar presentes em todas as imagens que vão ser comparadas e são necessários para o cálculo das localizações correspondentes entre os géis.

6.6 - DIGE - *Difference Gel Electrophoresis*

Para confecção dos géis fluorescentes foram escolhidos os tempos de 0,5 h e 4 h após infecção por *B. abortus* 2308. A Tabela 5 mostra o delineamento da marcação das amostras com os corantes fluorescentes.

Tabela 5. Delineamento usado na marcação das amostras de proteínas com corantes fluorescentes (*Dye Swap*)

Gel	Amostras (50 µg proteínas + 400 pmol de cada corante)		
	Cy5	Cy3	Cy2 (Padrão Interno)
1	Controle 0,5 h	Infectado 0,5 h	Mistura das amostras*
2	Infectado 0,5 h	Controle 0,5 h	Mistura das amostras*
3	<i>Brucella abortus</i> 2308	Controle 0,5 h	Mistura das amostras*
4	Infectado 0,5 h	<i>Brucella abortus</i> 2308	Mistura das amostras*
5	Controle 4 h	Infectado 4 h	Mistura das amostras*
6	Infectado 4 h	Controle 4 h	Mistura das amostras*
7	<i>Brucella abortus</i> 2308	Controle 4 h	Mistura das amostras*
8	Infectado 4 h	<i>Brucella abortus</i> 2308	Mistura das amostras*

* 10 µg Controle 0,5 h + 10 µg Infectado 0,5 h + 10 µg Controle 4 h + 10 µg Infectado 4 h + 10 µg *Brucella abortus* 2308

As Figuras 10, 11, 12 e 13 mostram as imagens dos géis 2D-DIGE obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados

ou não por *Brucella abortus* e de extratos de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h corados pelos corantes fluorescentes Cy5, Cy3 e Cy2.

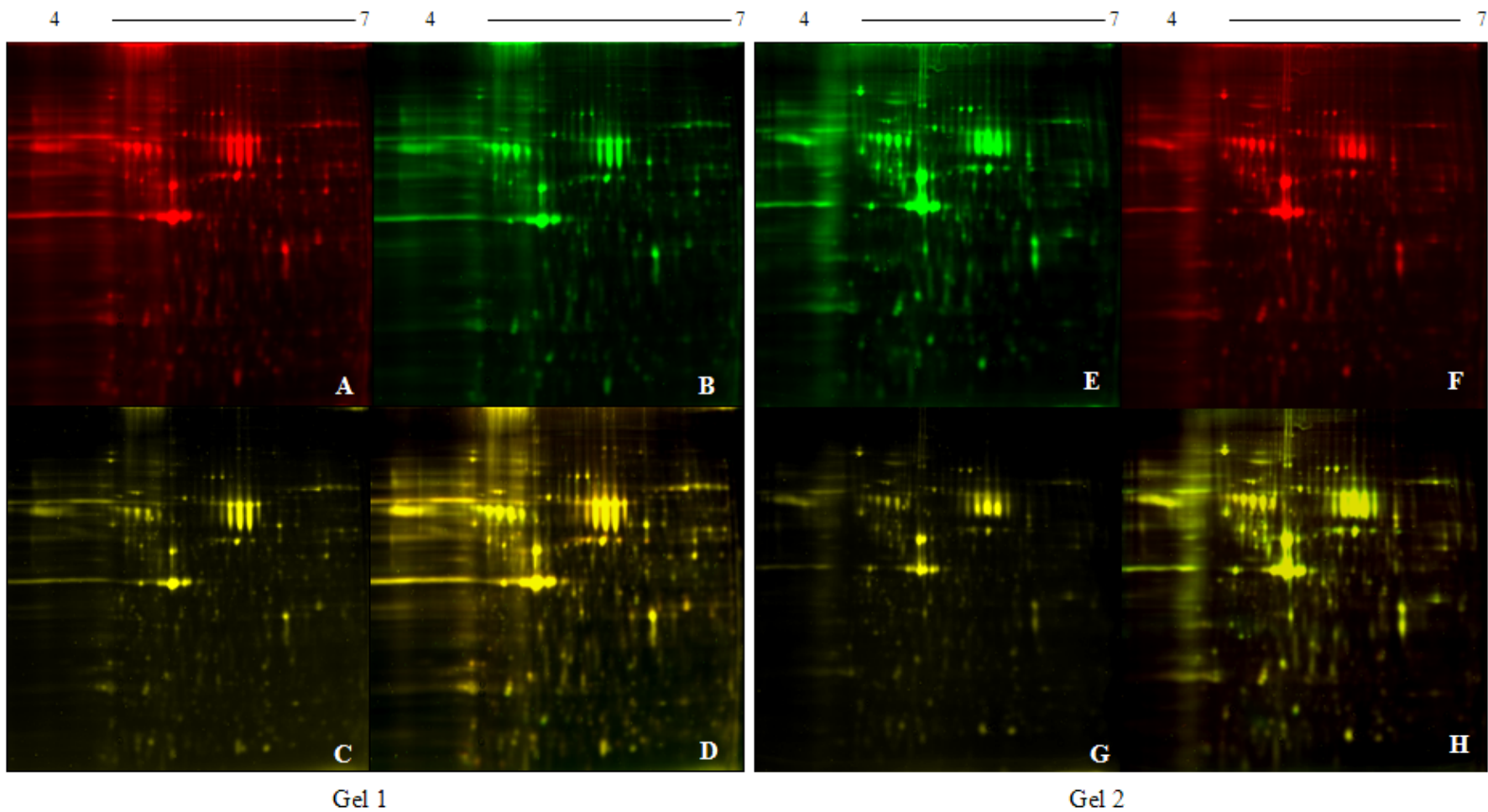


Figura 10. Géis 2D-DIGE 1 e 2 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308. A – Extrato proteico de trofoblastos controle 0,5 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos infectados 0,5 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extrato proteico de trofoblastos controle 0,5 h (Cy3, verde); F – Extrato proteico de trofoblastos infectados 0,5 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H - Imagens sobrepostas.

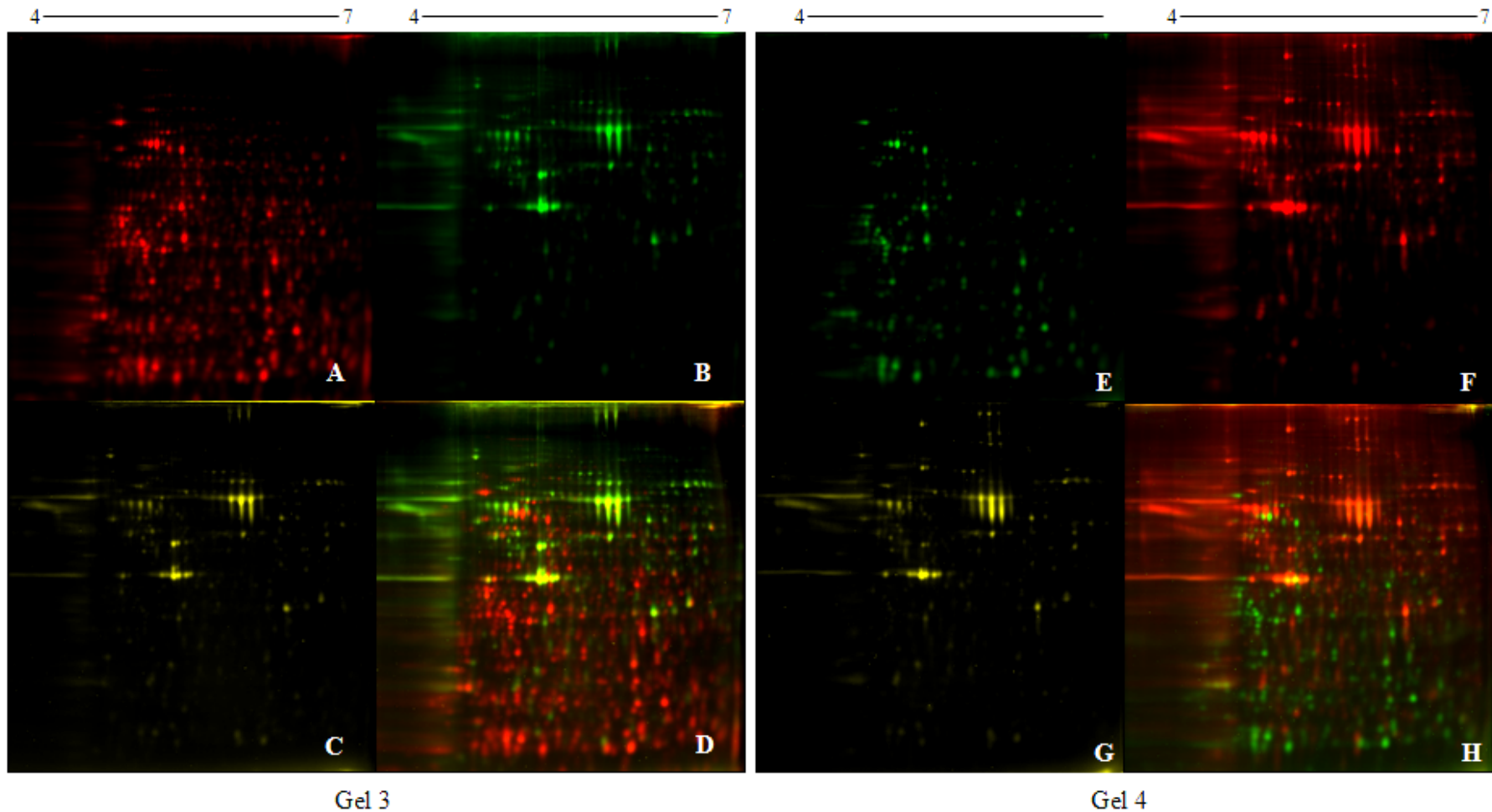


Figura 11. Géis 2D-DIGE 3 e 4 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308 e de extratos de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h. A – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos controles 0,5 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada pro 24 h (Cy3, verde); F - Extrato proteico de trofoblastos infectados 0,5 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H- Imagens sobrepostas.

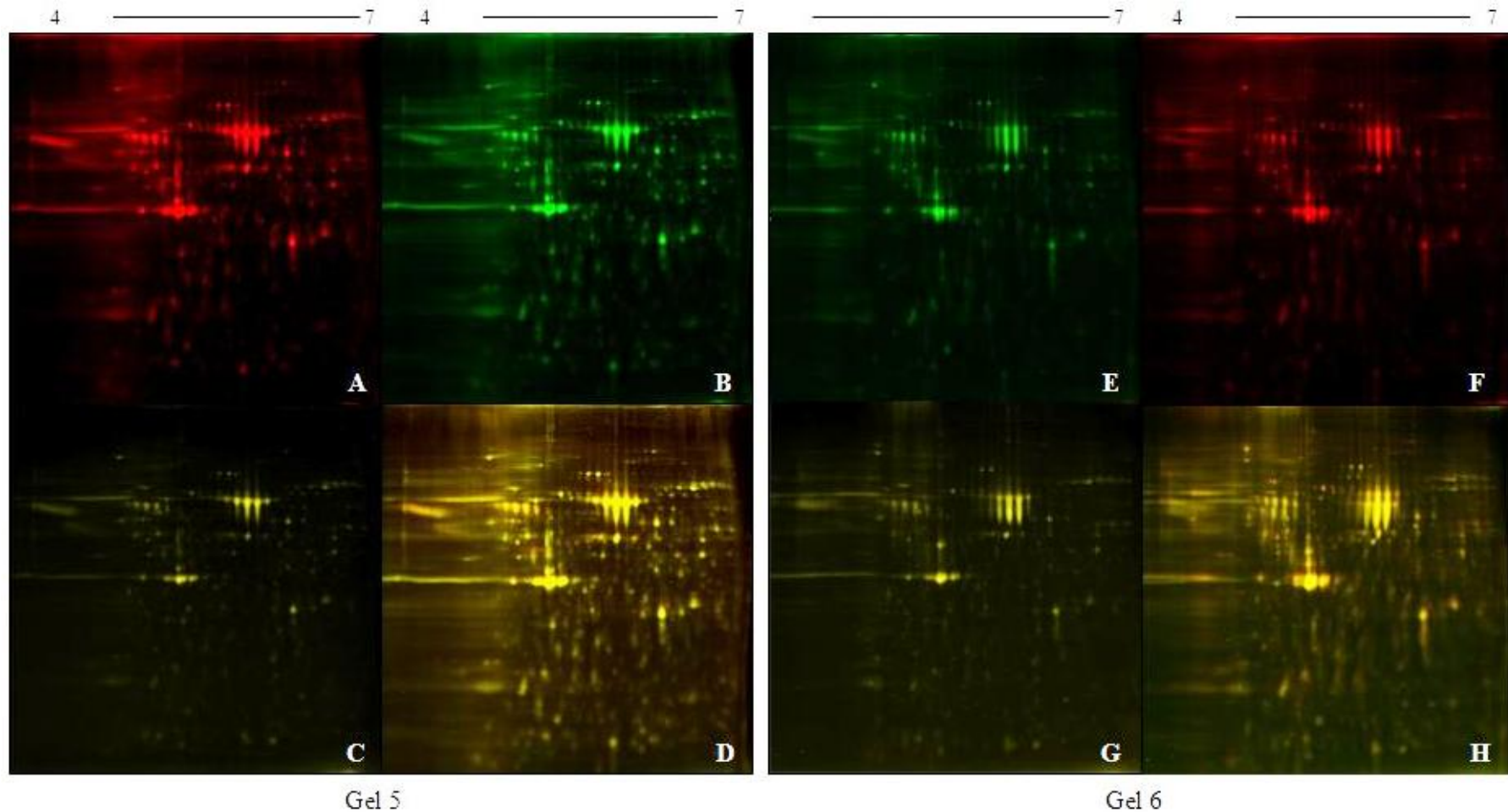


Figura 12. Géis 2D-DIGE 5 e 6 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308. A – Extrato proteico de trofoblastos controle 4 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos infectados 4 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extratos proteico de trofoblastos controle 4 h (Cy3, verde); F – Extrato proteico de trofoblastos infectados 4 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H - Imagens sobrepostas.

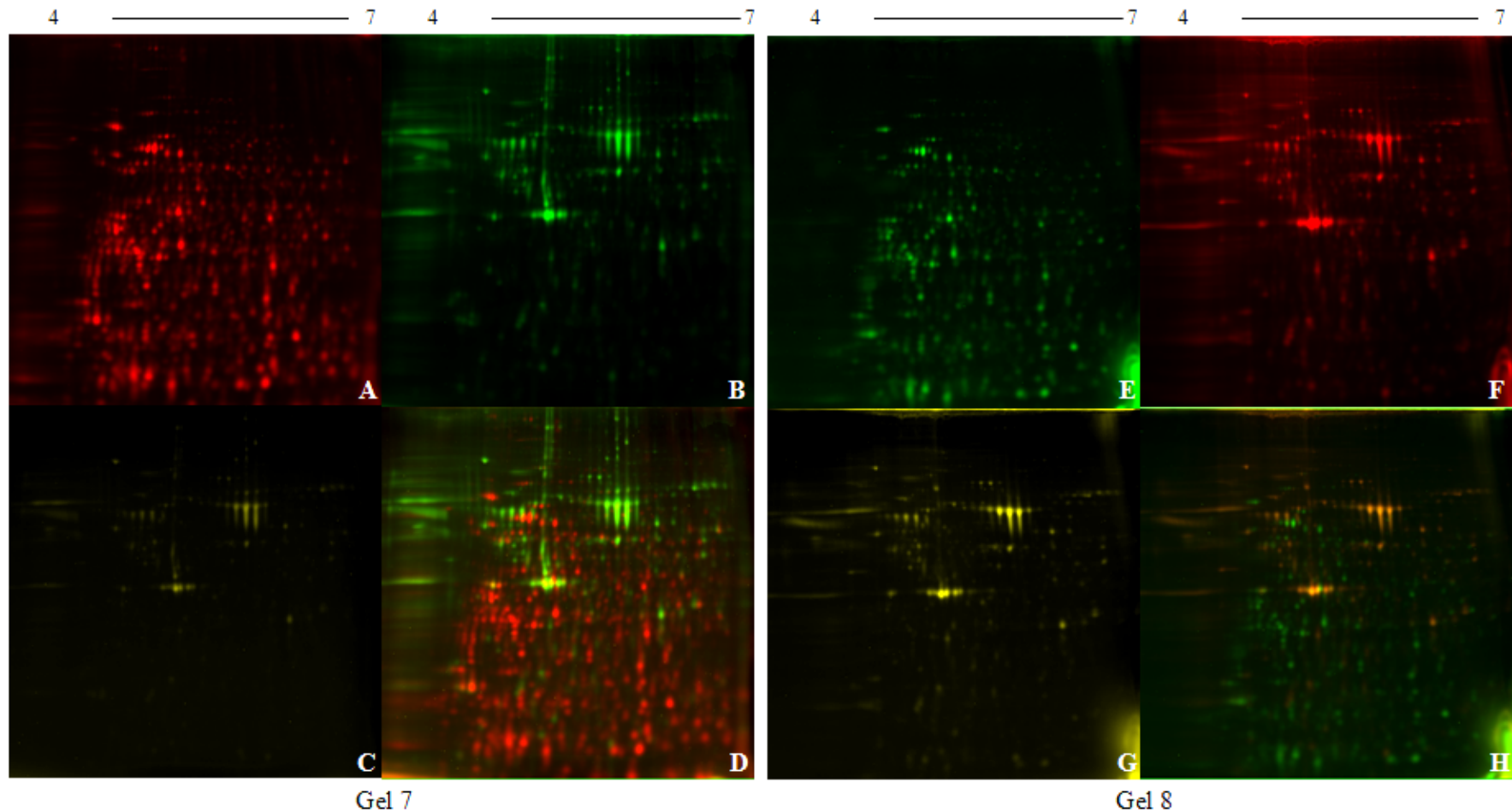


Figura 13. Géis 2D-DIGE 7 e 8 (IPG pH 4 a 7, 18 cm - GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes da membrana cório-alantóidea de bovinos infectados ou não por *Brucella abortus* 2308 e de extratos de *Brucella abortus* 2308 cultivada por 24 h. A – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada pro 24 h (Cy5, vermelho); B – Extrato proteico de trofoblastos controle 4 h (Cy3, verde); C - Padrão Interno (Cy2, amarelo), D - Imagens sobrepostas; E – Extrato proteico de *Brucella abortus* 2308 cultivada por (Cy3, verde); F – Extrato proteico de trofoblastos infectados 4 h (Cy5, vermelho); G - Padrão Interno (Cy2, amarelo); H - Imagens sobreposta

As imagens digitalizadas foram analisadas pelo programa *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software* v7.0 (GE Healthcare, Inglaterra). Inicialmente foi realizada a detecção automática do número de *spots* presentes em cada gel (2.500 *spots* estimados) seguida de exclusão de artefatos pela criação de filtros de exclusão. *Spots* com valores de inclinação (*slope*) inferior a 2,0 e área inferior a 450 foram excluídos.

Para avaliar se as imagens obtidas pela digitalização dos géis possibilitavam a detecção quantitativa de *spots* muito escuros ou muito claros foram calculadas as ordens de magnitude ou *Dynamic Range* (DR) de cada gel.

DR representa o número de *bits* usados para representar cada pixel em uma imagem e por isso determina o número de cores ou sombras de cinza (escala de cinza) que podem estar presentes em uma imagem digital.

Variações do DR em um sistema têm impacto maior na qualidade das imagens digitalizadas do que a resolução. Sistemas de imagens de alta qualidade são mais sensíveis para série de cores de um espectro e podem registrar as menores diferenças entre duas ou mais cores quase idênticas. Em análises de múltiplos géis é importante a determinação do DR para verificação se é possível fazer a comparação entre eles com confiabilidade.

Para calcular o DR de cada imagem foi usada a equação:

$$DR = \log \text{ do volume do } spot \text{ com maior volume} - \log \text{ do volume do } spot \text{ com o menor volume}$$

O *Typhoon™ Variable Mode Imager* oferece um intervalo dinâmico linear de cinco ordens de magnitude, dessa forma os valores obtidos devem ser menores que cinco. Na Tabela 6 são mostrados os valores de DR para cada gel:

Tabela 6. Valores de *Dynamic Range* obtidos para cada gel analisado

Gel	Amostras coradas			Valor DR*
	Cy5	Cy3	Cy2	
1	Controle 0,5 h	Infectado 0,5 h	Mistura das amostras	4,428
2	Infectado 0,5 h	Controle 0,5 h	Mistura das amostras	4,131
3	<i>Brucella abortus</i> 2308	Controle 0,5 h	Mistura das amostras	4,082
4	Infectado 0,5 h	<i>Brucella abortus</i> 2308	Mistura das amostras	3,856
5	Controle 4 h	Infectado 4 h	Mistura das amostras	3,768
6	Infectado 4 h	Controle 4 h	Mistura das amostras	3,901
7	<i>Brucella abortus</i> 2308	Controle 4 h	Mistura das amostras	4,318
8	Infectado 4 h	<i>Brucella abortus</i> 2308	Mistura das amostras	4,704

DR= ordem de magnitude

Como foram obtidos valores inferiores a 5 para todas as imagens digitalizadas foi possível realizar de forma confiável as análises quantitativas entre *spots* correspondentes entre os géis avaliados.

A inclusão da amostra de *B. abortus* no experimento foi feita com o objetivo de ajudar a avaliar se proteínas diferencialmente expressas detectadas em células trofoblásticas infectadas poderiam ser da bactéria ou das células infectadas. Porém, não foi possível realizar essa análise

já que os perfis de expressão das amostras de proteínas de células trofoblásticas e de *B. abortus* são muito diferentes.

Desta forma, as imagens obtidas de géis de *B. abortus* foram retiradas das análises posteriores nas quais foram feitas comparações entre o perfil de expressão de células trofoblásticas controle e infectadas nos dois tempos avaliados.

A seguir, foi realizado o *Match* entre os géis analisados para que comparações entre *spots* correspondentes em cada gel pudessem ser realizadas.

Foi obtida percentagem de *Match* acima de 90% entre os géis de amostras infectadas e não infectadas e nos dois tempos avaliados.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P \geq 0,05$) entre os *spots* correspondentes dos géis de amostras de

células trofoblásticas controle e infectadas nos dois tempos avaliados.

Da mesma forma, quando comparados os tempos avaliados dentro do mesmo grupo experimental, também não foram identificados *spots* com alterações estatísticas significativas.

Interessantemente, apesar de não terem sido identificados *spots* com diferenças quantitativas significativas entre os grupos experimentais avaliados, vários *spots* presentes em um único grupo experimental foram detectados (diferenças qualitativas). Esses *spots* foram numerados e selecionados para a identificação por espectrometria de massa. A Tabela 7 mostra as comparações feitas entre os grupos experimentais e tempos avaliados nos estudos e o número de *spots* selecionados em cada situação para identificação por espectrometria de massa.

Tabela 7. Diferenças qualitativas observadas entre os géis obtidos de extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea bovina infectados ou não por *Brucella abortus* 2308 nos tempos de 0,5 e 4 h após infecção

Grupo Experimental	Grupo Comparado	Identificação <i>Spots</i> selecionados	Total de <i>Spots</i> selecionados
Controle 0,5 h	Controle 4 h	1 ao 31	31
	Infectados 0,5 h	40 ao 47	8
	Total		39
Controle 4 h	Controle 0,5 h	51 ao 57	7
	Infectados 4 h	60 ao 62	3
	Total		10
Infectados 0,5 h	Infectados 4 h	71 ao 76	6
	Controle 0,5 h	80 ao 95	16
	Total		22
Infectados 4 h	Infectados 0,5 h	100 ao 113	14
	Controle 4 h	120 ao 137	18
	Total		32
Total Geral			103

As Figuras 14 e 15 mostram os *spots* selecionados e numerados para identificação

por espectrometria de massa.

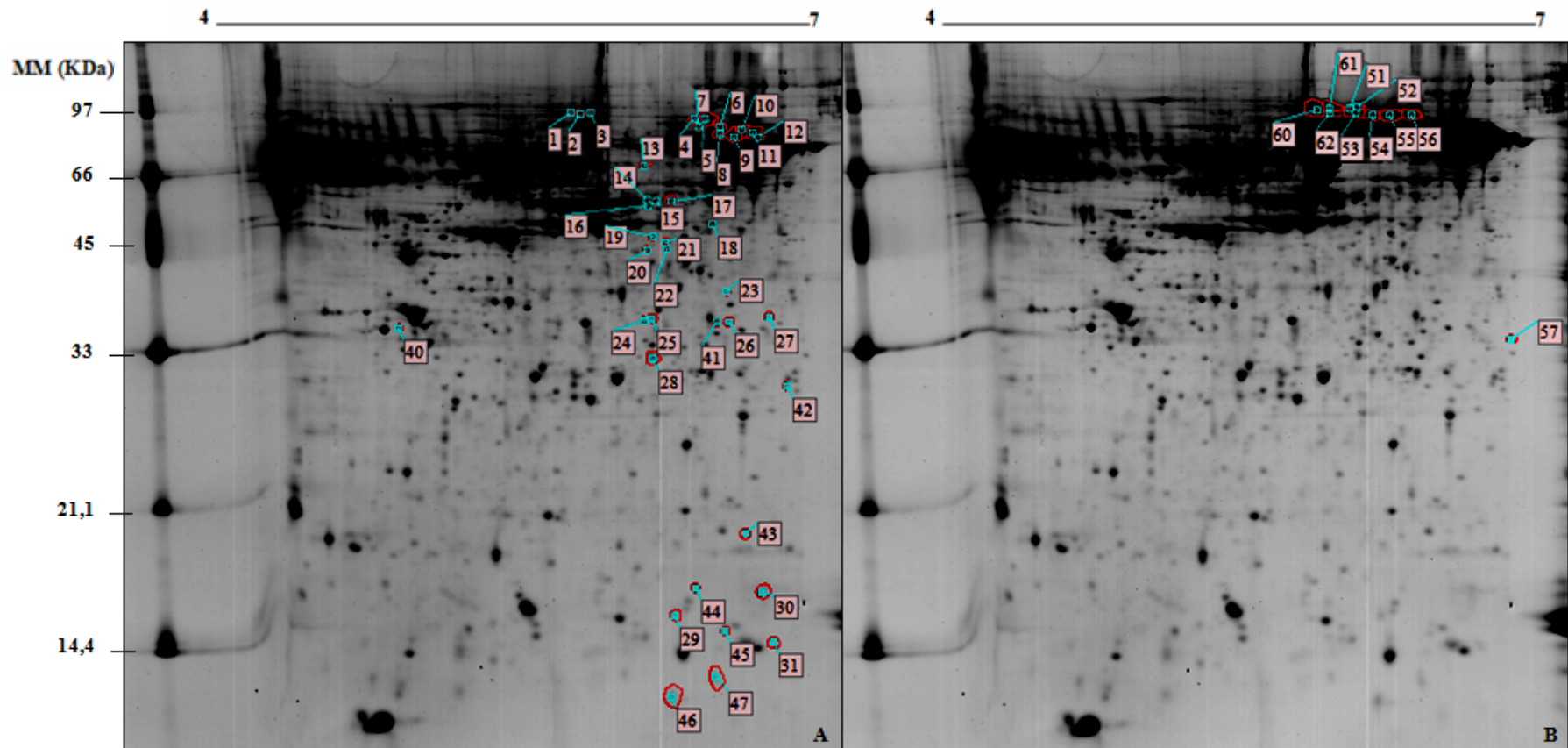


Figura 14. Géis 2DE 12% corados por *Coomassie Brilliant blue* 250-G (IPG pH 4 a 7, 7cm GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle mostrando o perfil de expressão de proteínas e *spots* selecionados para identificação por espectrometria de massa. A - *Spots* número 1 a 47 retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas controle no tempo de 0,5 h. B - *Spots* número 51 a 62 retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas controle no tempo de 4 h.

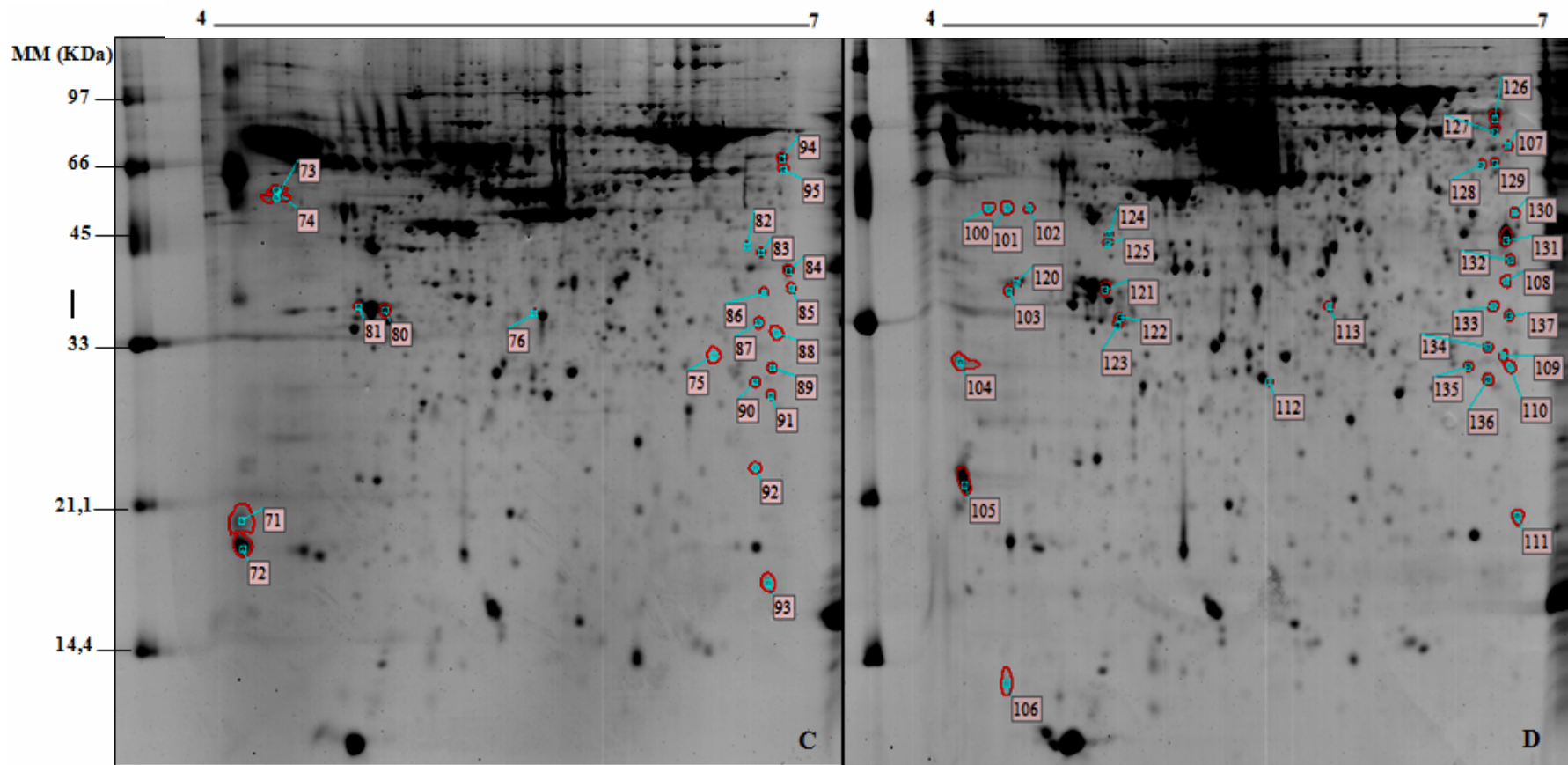


Figura 15. Géis 2DE 12% corados por *Coomassie Brilliant blue* 250-G (IPG pH 4 a 7, 7cm GE Healthcare, Inglaterra) obtidos de extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectados por *Brucella abortus* 2308 mostrando o perfil de expressão de proteínas e *Spots* selecionados para identificação por espectrometria de massa. C - *Spots* número 71 a 95 retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas após 0,5 h de infecção por *B. abortus*. D - *Spots* número 100 a 137 retirados do gel confeccionado com amostras de proteínas de células trofoblásticas após 4 h de infecção por *B. abortus*.

6.7 - Identificação dos *spots* por Espectrometria de Massa

De um total de 103 *spots* analisados por espectrometria de massa, 74 (72%) tiveram as proteínas neles contidos identificadas. Contudo, 29 *spots* (28%) não foram

identificados. A Tabela 8 mostra os *spots* não identificados e seus respectivos grupos experimentais:

Tabela 8. *Spots* não identificados por espectrometria de massa.

Grupos Experimentais	Numeração <i>Spots</i> não Identificados	Total
Controle 0,5 h	4, 23, 24, 27, 28, 40, 41, 42, 44, 46 e 47	11
Controle 4 h	52 e 57	2
Infectado 0,5 h	73, 75, 85, 87 e 92	5
Infectado 4 h	108, 109, 110, 111, 113, 120, 122, 123, 125 e 132 e 133	11
Total		29

Dos 72 peptídeos identificados, 71 (98,61%) foram correspondentes às proteínas produzidas por *Bos taurus*, ou seja, são proteínas produzidas pelas células trofoblásticas. Apenas os peptídeos identificados no *spot* número 129 obtiveram *Match* com escore significativo na busca no banco de dados de *B. taurus* e *B. abortus* (Anexo 2).

Os 74 *spots* identificados correspondem a 51 proteínas que foram classificadas em 13 categorias funcionais pelo FunCat (*Functional Classification of Proteins*) (MIPS – Munich Information Center for Protein Sequences) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/mfungd/Search/Catalogs/searchCatfirstFun.html>).

Em vários *spots* foram identificadas isoformas da mesma proteína e também no mesmo *spot* foram identificadas mais e uma proteína com valores de massa e pI semelhantes (Tabela 9).

Também é interessante notar que as proteínas identificadas apresentam alterações da massa molecular assim como alterações nos valores de pI (Anexo 3), indicando que as proteínas identificadas são proteínas que sofreram modificações pós-traducionais.

Para melhor compreensão da distribuição das proteínas identificadas em relação à sua função e ao grupo experimental no qual elas foram detectadas, foi construída a Tabela 9 mostrando a lista de proteínas e seus respectivos grupos.

A Tabela 9 mostra a classificação das proteínas de acordo com a função, a localização subcelular de cada uma e o grupo experimental no qual elas foram identificadas.

Tabela 9. Classificação funcional, localização subcelular e grupo experimental no qual foram identificadas as proteínas expressas em células trofoblásticas infectadas ou não por *Brucella abortus* 2308 nos tempos de 0,5 h e 4 h após infecção, usando o modelo de explantes de membrana córion-alantóidea retirada de útero gestante.

Número de identificação do spot*	Classificação Funcional	Abreviatura	Grupo em que foram identificadas**	Localização Subcelular	Total
BIOGÊNESE DE COMPONENTES CELULARES					
14, 15, 16 e 17	<i>cytokeratin 8</i>	KRT8	C 0,5 h	Membrana plasmática/Filamentos intermediários	6
31	<i>dynein light chain roadblock-type 1</i>	DYNLRB1	C 0,5 h	Citoesqueleto/Citoplasma	
25	<i>F-actin-capping protein subunit beta</i>	CAPZB	C 0,5 h	Citoplasma/Citoesqueleto de actina	
74 / 130	<i>keratin 14-like, partial</i>	KRT7	I 0,5 h/ I 4 h	Filamentos Intermediários	
95 / 127	<i>keratin, type II cytoskeletal 7</i>	KRT14	I 0,5 h/ I 4 h	Filamentos Intermediários	
29	<i>transgelin-2</i>	TAGLN	C 0,5 h	Citoplasma	
CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA					
71 e 72 / 105	<i>calmodulin similar to BOLA-like protein 2 isoform 1</i>	CALM BOLA2	I 0,5 h/ I 4 h C 0,5 h	Citoplasma/Citoesqueleto de actina Secretada	2
DEFESA E VIRULÊNCIA					
90 e 135	<i>thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial</i>	PRDX3	I 0,5 h/ I 4 h	Mitocôndria	1
COMUNICAÇÃO CELULAR / MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL					
100, 101 e 102	<i>placental prolactin related protein 2 precursor</i>	PRCII	I 4 h	Núcleo/Componente da Matrix extracelular	1

	TRANSPORTE CELULAR				2
104	<i>ras-related protein Rab-11A</i>	RAB11A	I 4 h	Aparato de Golgi/ vesículas/endossomo	
80	<i>secretory carrier-associated membrane protein 2</i>	SCAMP2	I 0,5 h	Aparato de Golgi/Rede de membranas	
	DESENVOLVIMENTO (Sistêmico)				1
43	LDLR <i>chaperone</i> MESD	MESDC2	C 0,5 h	Retículo endoplasmático	
	ENERGIA				1
112	NADH <i>dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8</i>	NDUFS8	I 4 h	Mitocôndria	
	METABOLISMO				14
21 e 22	<i>3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1</i>	BPNT1	C 0,5 h	Citoplasma	
91 e 136	<i>abhydrolase domain-containing protein 14B</i>	ABDHD14	I 0,5 h/ I 4 h	Citoplasma/Núcleo	
129	<i>adenosylhomocysteinase</i>	AHCY	I 4 h	Citoplasma	
83	<i>aldose 1-epimerase</i>	GALM	I 0,5 h	Citoplasma	
84 e 131	<i>aldose reductase</i>	AKR1B1	I 0,5 h/ I 4 h	Citoplasma	
95 e 127	<i>beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein</i>	HEXB	I 0,5 h/ I 4 h	Vacúolo ou lisossomo	
82	<i>biliverdin reductase A</i>	BLVRA	I 0,5 h	Citoplasma	
18	<i>creatine kinase B-type</i>	CKB	C 0,5 h	Citoplasma/Mitocôndria	
13	<i>inositol-3-phosphate synthase 1</i>	ISYNA1	C 0,5 h	Citoplasma	
84 / 131	<i>malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	MDH1	I 0,5 h/ I 4 h	Citoplasma	
128	<i>ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor</i>	OAT	I 4 h	Mitocôndria	
106	<i>proactivator polypeptide</i>	PSAPL1	I 4 h	Vacúolo ou lisossomo	
106	<i>prosaposin</i>	PSAP	I 4 h	Mitocôndria/Vacúolo ou lisossomo	
30	<i>transthyretin precursor</i>	TTR	C 0,5 h	Secretada	
	PROTEINA FATE (enovelamento, modificação, destino)				6
19	<i>activator of 90 kDa heat shock protein ATPase</i>	AHSA1	C 0,5 h	Citoplasma/Retículo endoplasmático	

	<i>homolog 1</i>				
18	<i>cathepsin D</i>	CTSD	C 0,5 h	Mitocôndria/Vacúolo ou lisossomo	
51/ 60 e 61	<i>endoplasmic precursor</i>	HSP90B1	C 4 h	Reticulo endoplasmático	
62	<i>heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSC70	C 4 h	Citoplasma	
89 / 134	<i>heat shock protein beta-1</i>	HSPB1	I 0,5 h/ I 4 h	Membrana plasmática/Citoplasma/Núcleo	
94 e 126	<i>protein disulfide-isomerase A3 precursor</i>	PDIA3	I 0,5 h/ I 4 h	Reticulo endoplasmático	
	SÍNTESE DE PROTEÍNA				
71	<i>ribosomal protein P1-like isoform 1</i>	RPLP1	I 0,5 h	Citoplasma	1
	PROTEÍNA COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU COFATOR (Estrutural or catalítica)				13
26	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor</i>	HIBADH	C 0,5 h	Mitocôndria	
8, 9, 10 e 11 / 56 / 107	<i>albumin protein</i>	ALB	C 0,5 h/ C 4 h/ I 4 h	Componente da matrix extracelular/Citoplasma	
51	<i>alpha-actinin-4</i>	ACTN4	C 4 h	Citoplasma/Citoesqueleto de actina	
6, 7 e 12 / 53, 54 e 55 / 86	<i>alpha-fetoprotein precursor</i>	AFP	C 0,5 h/ C 4 h/ I 0,5 h	Citoplasma/Extracelular/Secretada	
18	<i>beta actin</i>	ACTB	C 0,5 h	Citoplasma/Citoesqueleto	
93	<i>galectin-7-like</i>	LGALS7	I 0,5 h	Citoplasma	
53, 54 e 55	<i>gelsolin isoform a</i>	GSNA	C 4 h	Citoesqueleto	
3 e 5 / 55	<i>gelsolin isoform b</i>	GSNB	C 0,5 h/ C 4 h	Citoesqueleto	
29	<i>hemoglobin subunit beta</i>	HBB	C 0,5 h	Mitocôndria	
88 / 137	<i>high-mobility group box 1-like</i>	HMGB1	I 0,5 h/ I 4 h	Citoplasma/Núcleo/Cromossomo/Extracelular/Proteína	
20	<i>prostaglandin reductase 2</i>	PTGR2	C 0,5 h	Citoplasma	
1 e 2	<i>transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	VCP	C 0,5 h	Citoplasma/Reticulo endoplasmático	
80 e 81/ 121 e 124	<i>tropomyosin 4 isoform 2</i>	TPM4	I 0,5 h/ I 4 h	Citoplasma/Citoesqueleto	

	REGULAÇÃO DO METABOLISMO E DA FUNÇÃO DE PROTEÍNAS				1
19	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5</i>	SERPINB5	C 0,5 h	Secretado/espaco extracelular	
	INTERAÇÃO SISTÊMICA COM O AMBIENTE				2
103	<i>complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor</i>	C1QPB	I 4 h	Mitocôndria/Matrix mitocondrial	
76	<i>toll-interacting protein</i>	TOLLIP	I 0,5 h	Citoplasma	
	Total Geral				51

* Número do *spot* se refere à identificação do *spot* nas Figuras 14 e 15; ** C 0,5 h – explante de membrana cório-alantóideia bovina controle no tempo de 0,5 h de cultivo; C 4 h – explante de membrana cório-alantóideia bovina controle no tempo de 4 h de cultivo; I 0,5 h – explante de membrana cório-alantóideia infectada por *Brucella abortus* 2308 0,5 h pós-infecção; I 4 h – explante da membrana cório-alantóideia infectada por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 4 h pós-infecção.

A comparação entre as categorias funcionais nas quais as proteínas identificadas foram classificadas mostra, no grupo infectado, proteínas com funções diferentes das observadas em amostras controle (Figura 16).

Foram identificadas apenas no grupo controle proteínas com funções relacionadas ao Desenvolvimento sistêmico (3%) e Regulação do metabolismo e da função de proteínas (3%) (Figura 16). Proteínas com funções relacionadas ao Transporte celular (5%), Defesa e virulência (5%), Interação

sistêmica com o ambiente (5%), Síntese de proteínas (2%), Energia (2%) e Comunicação celular e processamento de DNA (2%) foram identificadas somente no grupo de amostras infectadas por *B. abortus* 2308 (Figura 16).

Proteínas com funções relacionadas ao Metabolismo, Proteínas com função de ligação e Cofatores, Biogênese de componentes celulares, Proteínas Fate, e Ciclo celular foram identificadas nos dois grupos experimentais (controle e infectados) (Figura 16).

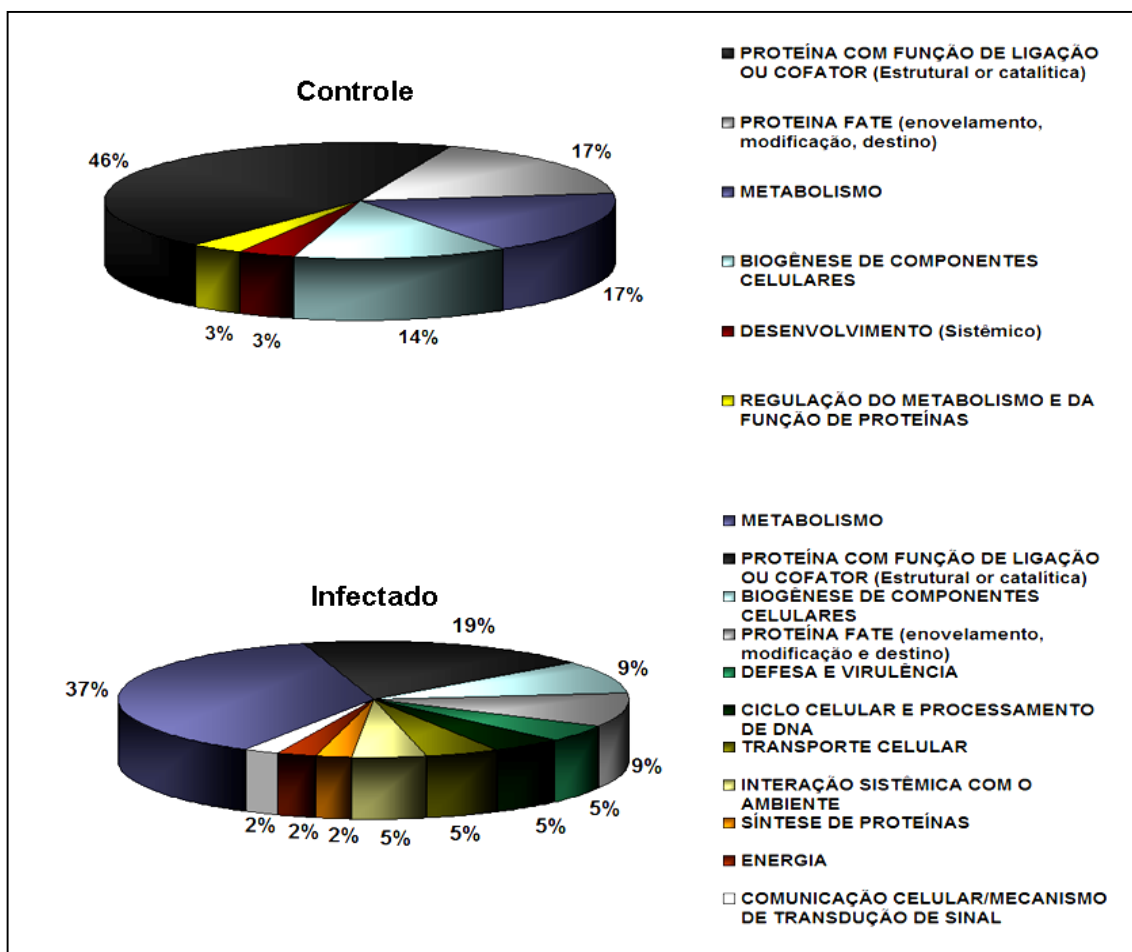


Figura 16. A - Distribuição funcional das proteínas identificadas por espectrometria de massa em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóideia bovina nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo após análise diferencial do perfil de expressão de proteínas por 2D-DIGE. B - Distribuição funcional das proteínas identificadas por espectrometria de massa em amostras de proteínas de células trofoblásticas infectadas por *Brucella abortus* 2308 presentes nos explantes de membrana cório-alantóideia bovina após análise diferencial do perfil de expressão de proteínas por 2D-DIGE.

O diagrama de Venn (Figura 17) mostra as proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes controle de membrana cório-alantóidea nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo e em explantes infectados por *B.*

abortus 2308 nos tempos de 0,5 e 4 h pós-infecção.

Também mostra que algumas proteínas foram identificadas em mais de um grupo experimental.

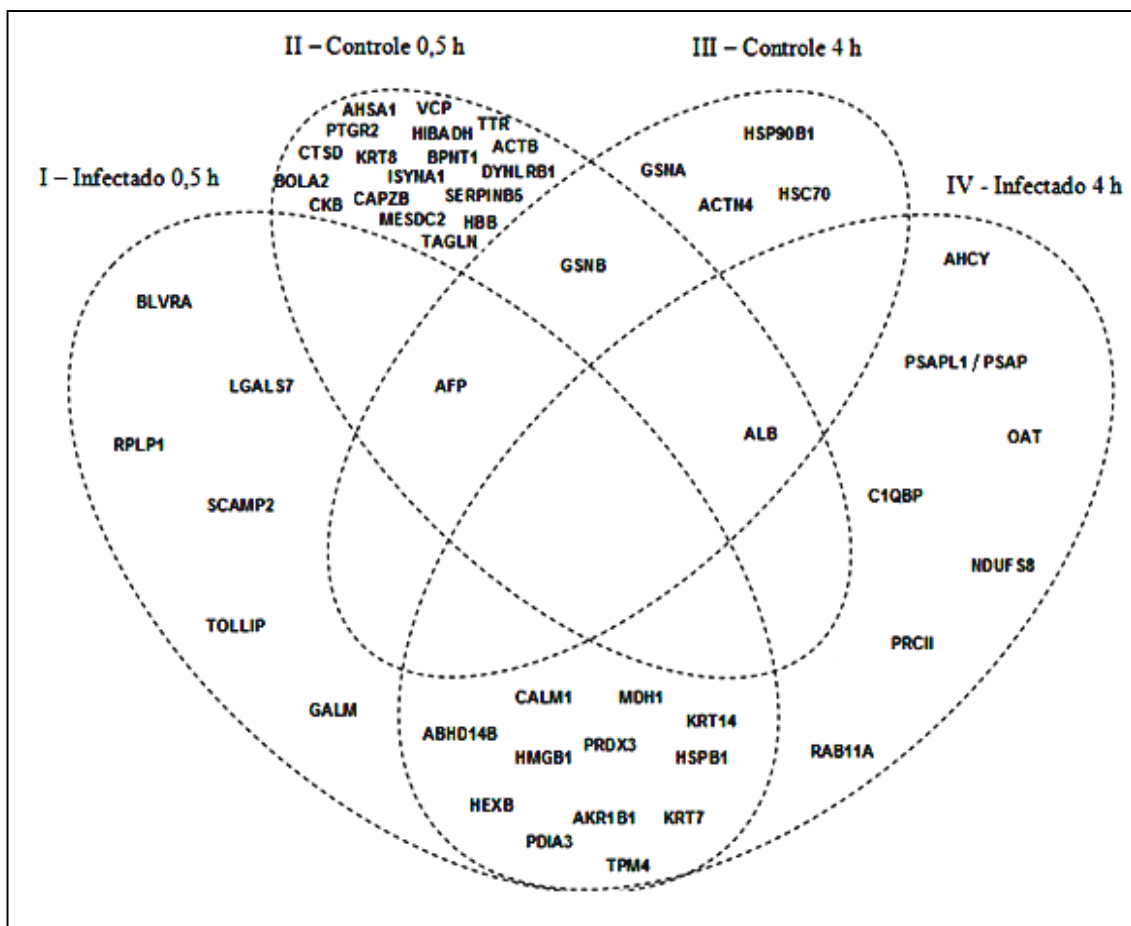


Figura 17. Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas em cada grupo experimental. I – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectadas por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 0,5 h após infecção: *biliverdin reductase A* (BLVRA), *galectin-7-like* (LGALS7), *ribosomal protein P1-like isoform 1* (RPLP1), *secretory carrier-associated membrane protein 2* (SCAMP2), *toll-interacting protein* (TOLLIP), *aldose 1-epimerase* (GALM); II – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle no tempo de 0,5 h após cultivo: *activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1* (AHS1), *transitional endoplasmic reticulum ATPase* (VCP), *prostaglandin reductase 2* (PTGR2), *3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor* (HIBADH), *transthyretin precursor* (TTR), *cathepsin D* (CTSD), *cytokeratin 8* (KRT8), *beta-actin* (ACTB), *3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1* (BPNT1), *similar to BOLA-like protein 2 isoform 1* (BOLA2), *inositol-3-phosphate synthase 1* (ISYNA1), *dynein light chain roadblock-type 1* (DYNLB1), *creatine kinase B-type* (CKB), *F-actin-capping protein subunit beta* (CAPZB), *serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5* (SERPINB5), *LDLR chaperone MESD* (MESDC2), *hemoglobin subunit beta* (HBB), *transgelin-2* (TAGLN); III – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle no tempo de 4 h: *gelsolin isoform a* (GSNA), *heat shock cognate 71 kDa protein* (HSC70),

endoplasmic precursor (HSP90B1), *alpha-actinin-4* (ACTN4); IV – Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectadas por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 4 h após infecção *adenosylhomocysteinase* (AHCY), *proactivator polypeptide/prosaposin* (PSAPL1/PSAP), *ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor* (OAT), *complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor* (C1QBP), *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8* (NDUFS8), *placental prolactin* (PRCII), *ras-related protein Rab-11A* (RAB11A); Proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectadas por *Brucella abortus* 2308 nos tempos de 0,5 h e 4 h após infecção: *calmodulin* (CALM1), *malate dehydrogenase, cytoplasmic* (MDH1), *thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor* (PRDX3), *abhydrolase domain-containing protein 14B* (ABHD14B), *keratin 14-like* (KRT14), *keratin, type II cytoskeletal 7* (KRT7), *high-mobility group box 1-like* (HMGB1), *heat shock protein beta-1* (HSPB1), *beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein* (HEXB), *aldose reductase* (AKR1B1), *protein disulfide-isomerase A3 precursor* (PDIA3), *tropomyosin 4* (TPM4); Proteínas identificadas (isoformas) em mais de um grupo experimental: *Albumin protein* (ALB) – identificada em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo e infectado por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 4 h após infecção; *alpha-fetoprotein precursor* (AFP) - identificada em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo e infectado por *Brucella abortus* 2308 no tempo de 0,5 h após infecção e *gelsolin isoform b* – (GSNB) - identificada em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea controle nos tempos de 0,5 h e 4 h de cultivo.

6.8 - Estudo da predição de interação entre as proteínas identificadas

A rede de interações predita construída a partir das proteínas identificadas apenas em amostras de explantes de membrana cório-alantóidea infectadas por *B. abortus* 2308 nos tempos de 0,5 e 4 horas após a infecção mostra a formação de quatro agrupamentos (Figura 18).

Em um destes agrupamentos é possível visualizar proteínas relacionadas principalmente aos mecanismos de reconhecimento do patógeno e resposta imunológica à infecção. Várias moléculas que participam do reconhecimento de patógenos via TLR (*Toll-like receptors*) estão diretamente relacionadas com *high-mobility group box 1-like* (HMGB1), identificada nos tempos 0,5 h e 4 h pós-infecção e com *toll-interacting protein* (TOLLIP), identificada no tempo de 0,5 h de infecção por *B. abortus* (Figuras 18 e 19 A; Anexo 4).

Outro grupamento é formado por proteínas relacionadas à produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e de respostas inflamatórias induzidas pelo estresse oxidativo. Em contrapartida, também nessa mesma rede estão presentes proteínas implicadas com a proteção tecidual contra o estresse oxidativo (Figuras 18 e 19 B; Anexo 4).

O grupamento C é formado pela proteína RAB11A e por seus parceiros preditos que desempenham funções associadas ao tráfego intracelular (Figuras 18 e 19 C; Anexo 4). Proteínas relacionadas com função estrutural e síntese de proteínas formam outro grupamento (Figura 18 e 19 D; Anexo 4)

Quatro proteínas não se associam à nenhuma outra proteína nesta rede de interações: *galectin-7-like* (LGALS7), *aldose 1-epimerase* (GALM), *secretory carrier-associated membrane protein 2* (SCAMP2), *beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein* (HEXB).

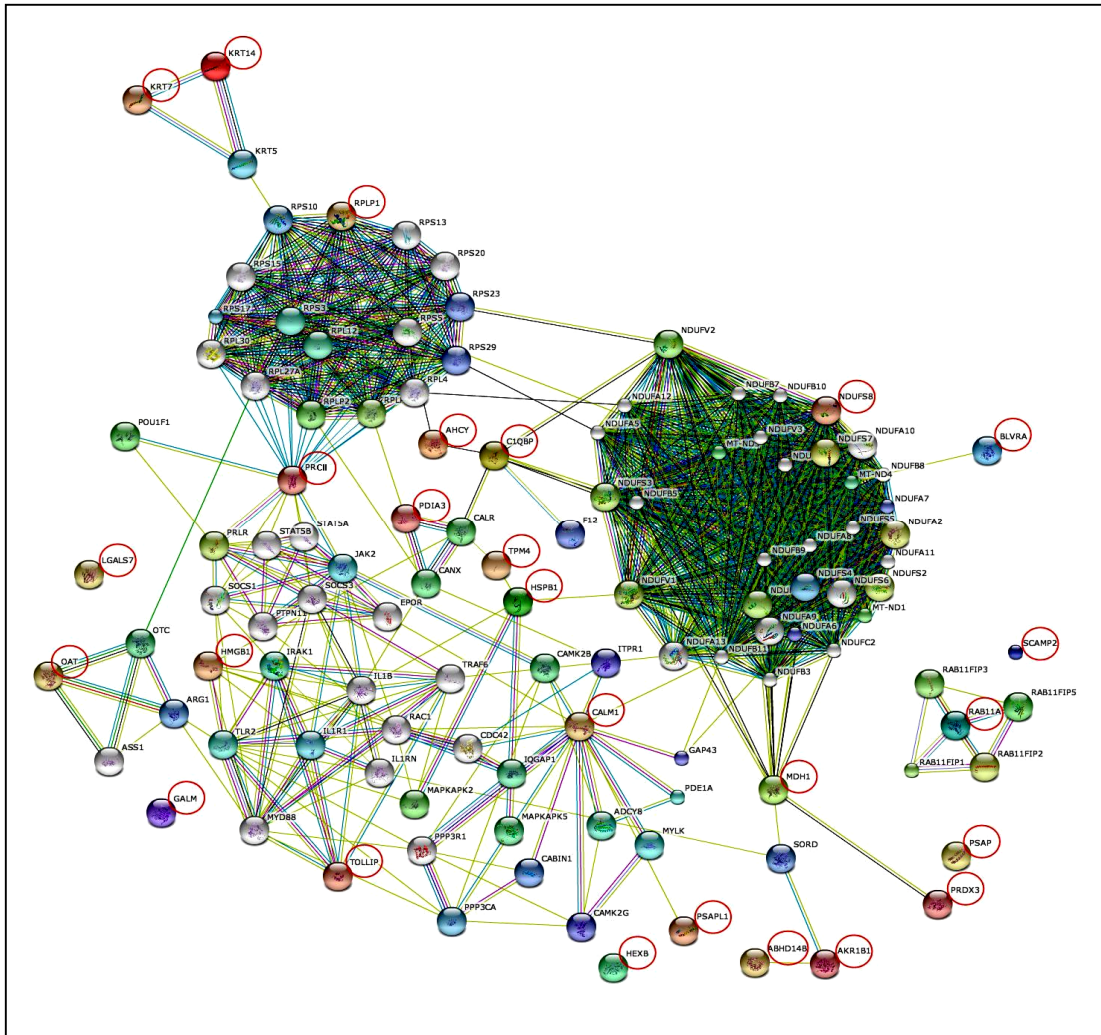
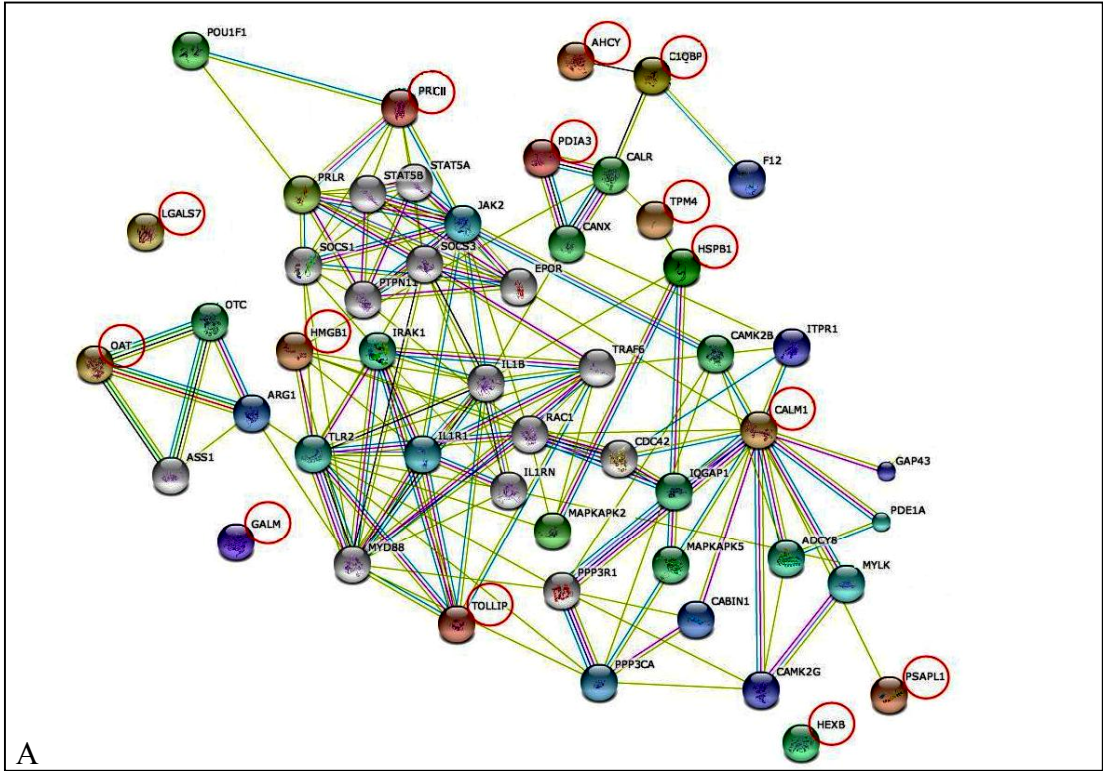
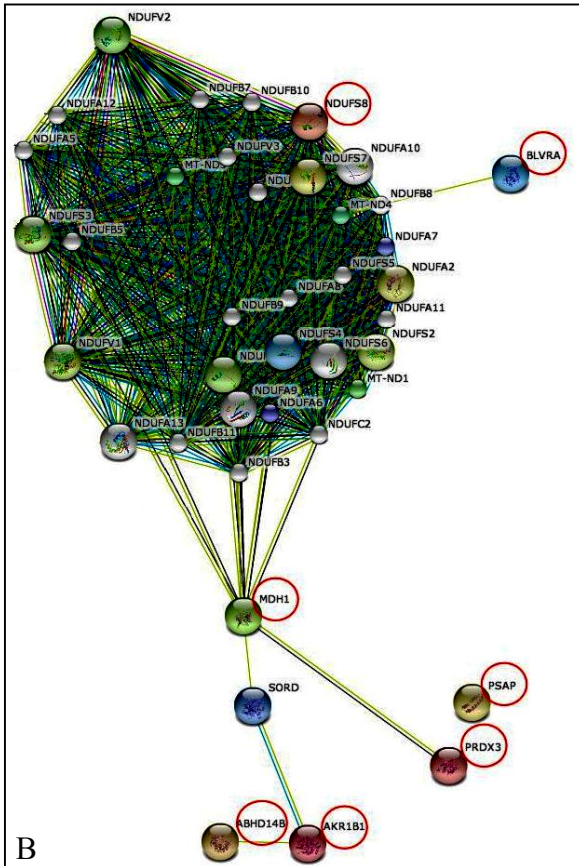


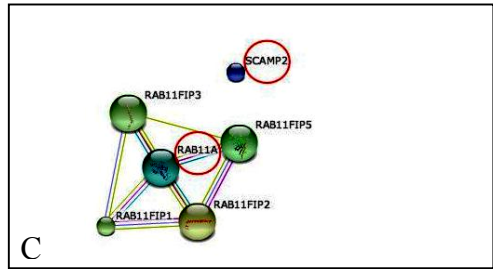
Figura 18. Predição das possíveis interações entre as proteínas identificadas em amostras de células trofoblásticas infectadas com *Brucella abortus* 2308. As proteínas identificadas em géis de células trofoblásticas infectadas (0,5 e 4 h) estão circuladas em vermelho: *biliverdin reductase A* (BLVRA), *galectin-7-like* (LGALS7), *ribosomal protein P1-like isoform 1* (RPLP1), *secretory carrier-associated membrane protein 2* (SCAMP2), *toll-interacting protein* (TOLLIP), *aldose 1-epimerase* (GALM), *adenosylhomocysteinase* (AHCY), *proactivator polypeptide/prosaposin* (PSAPL1/PSAP), *ornithine aminotransferase*, *mitochondrial precursor* (OAT), *complement component 1 Q subcomponent-binding protein*, *mitochondrial precursor* (C1QBP), *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8* (NDUFS8), *placental prolactin* (PRCII), *ras-related protein Rab-11A* (), *calmodulin* (CALM1), *malate dehydrogenase*, *cytoplasmic* (MDH1), *thioredoxin-dependent peroxide reductase*, *mitochondrial precursor* (PRDX3), *abhydrolase domain-containing protein 14B* (ABHD14B), *keratin 14-like* (KRT14), *keratin, type II cytoskeletal 7* (KRT7), *high-mobility group box 1-like* (HMGB1), *heat shock protein beta-1* (HSPB1), *beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein* (HEXB), *aldose reductase* (AKR1B1), *protein disulfide-isomerase A3 precursor* (PDIA3), *tropomyosin 4* (TPM4). Parceiros preditos: Anexo 4. As cores das linhas indicam as possíveis associações: verde - ativação; vermelho - inibição; azul - ligação; azul claro - fenótipo; roxo - catálise; rosa - modificações pós-traducionais; preto - reação e amarelo - expressão.



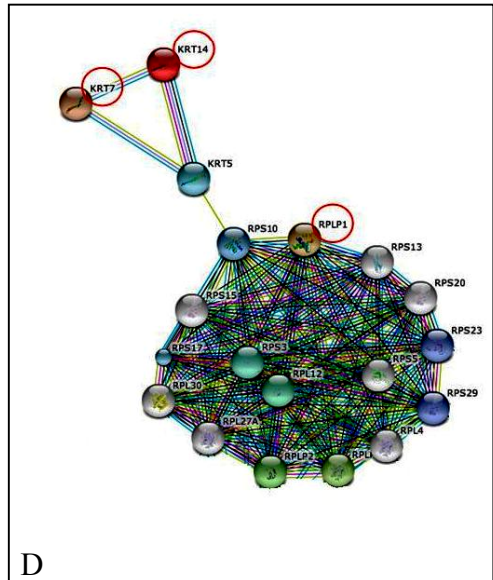
A



B



C



D

Figura 19. Grupamentos formados na rede de predição de interação pelas proteínas identificadas em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea bovina infectados por *Brucella abortus* 2308 nos tempos de 0,5 h e 4 h pós-infecção. A – Grupamento formado por proteínas relacionadas principalmente aos mecanismos de reconhecimento do patógeno e resposta imunológica à infecção. B – Grupamento formado por proteínas relacionadas à produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e por proteínas com função antioxidante. Grupo C – Grupamento formado por proteínas relacionadas ao tráfego intracelular. D - Grupamento formado por proteínas com função estrutural e relacionadas à síntese de proteínas. As proteínas identificadas em géis de células trofoblásticas infectadas (0,5 e 4 h) estão circuladas em vermelho. Abreviaturas: *biliverdín reductase A* (BLVRA), *galectin-7-like* (LGALS7), *ribosomal protein P1-like isoform 1* (RPLP1), *secretory carrier-associated membrane protein 2* (SCAMP2), *toll-interacting protein* (TOLLIP), *aldose 1-epimerase* (GALM), *adenosylhomocysteinase* (AHCY), *proactivator polypeptide/prosaposin* (PSAPL1/PSAP), *ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor* (OAT), *complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor* (C1QBP), *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8* (NDUFS8), *placental prolactin* (PRCII), *ras-related protein Rab-11A* (RAB11A), *calmodulin* (CALM1), *malate dehydrogenase, cytoplasmic* (MDH1), *thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor* (PRDX3), *abhydrolase domain-containing protein 14B* (ABHD14B), *keratin 14-like* (KRT14), *keratin, type II cytoskeletal 7* (KRT7), *high-mobility group box 1-like* (HMGB1), *heat shock protein beta-1* (HSPB1), *beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein* (HEXB), *aldose reductase* (AKR1B1), *protein disulfide-isomerase A3 precursor* (PDIA3), *tropomyosin 4* (TPM4). Parceiros preditos: Anexo 4. As cores das linhas indicam as possíveis associações: verde - ativação; vermelho - inibição; azul - ligação; azul claro - fenótipo; roxo - catálise; rosa - modificações pós-traducionais; preto - reação e amarelo - expressão.

7 - DISCUSSÃO

Esse estudo visou melhorar o entendimento sobre as interações patógeno-hospedeiro em bovinos infectados por *B. abortus*. Para isso, foram usadas ferramentas de análise proteômica para tentar identificar proteínas com papel relevante na infecção de células trofoblásticas bovinas por *B. abortus*. Esse é o primeiro estudo a avaliar o perfil diferencial de expressão de proteínas de células trofoblásticas bovinas infectadas por *B. abortus* e o nosso grupo é um dos poucos a realizar experimentos usando o modelo de cultivo *ex vivo* de células trofoblásticas pela confecção de explantes de membrana cório-alantóidea.

Estudos proteômicos são considerados ferramentas fundamentais na análise de eventos biológicos e permitem a identificação de perfis proteicos relacionados à determinadas situações patológicas ou não (Tannu e Hemby, 2006). Contudo, são poucos os estudos que

avaliaram os perfis proteômicos resultantes da interação entre *B. abortus* e as células alvo da infecção e os que foram realizados até o momento, usaram como modelo a infecção de células fagocíticas (DeIvechio *et al.*, 2002, Al Dahouk *et al.*, 2008; Lamontagne *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos na análise da cinética da infecção por *B. abortus* em explantes da membrana cório-alantóidea usando géis bidimensionais (2DE) corados por *Coomassie Brilliant blue* demonstraram que o perfil geral de expressão de proteínas não sofreu alterações quantitativas significativas nos tempos avaliados. Os tempos que apresentaram as maiores diferenças qualitativas (0,5 h e 4 h) foram os escolhidos para realização de um método mais sensível, o DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*).

Na análise dos géis diferenciais fluorescentes não foi possível comparar o perfil de expressão proteômica de *B.*

abortus com o perfil das células trofoblásticas, pois o perfil de expressão de *B. abortus* é muito diferente e forma um grupo à parte em relação aos perfis de células trofoblásticas bovinas. Desta forma, os géis DIGE de amostras de *Brucella abortus* 2308 cultivadas por 24 h foram excluídos das análises subsequentes.

Além disso, não foram encontradas diferenças quantitativas significativas entre *spots* correspondentes dos géis de amostras controle e infectadas nos dois tempos analisados ($P \geq 0,05$) corroborando com os experimentos da cinética da infecção, nos quais quatro *spots* com alteração quantitativa significativa foram detectados.

O padrão geral de expressão de proteínas se manteve estável durante os tempos avaliados e entre os géis de amostras de trofoblastos controle e infectados (*Match* superior a 90%). Interessantemente, também como observado nos géis 2DE corados por *Coomasie Brilliant blue*, foram identificadas diferenças qualitativas entre os géis que se tornaram o foco principal do nosso estudo.

Desta forma, foram selecionados 103 *spots* dos quais 74 (72%) foram identificados por espectrometria de massa. Os restantes 29 (28%) *spots* não foram identificados por serem de proteínas fracamente expressas e que por isso não tinham quantidade de proteínas suficientes para que fossem identificadas.

Apesar de ter sido empregado o passo de lavagens adicionais dos explantes de membrana cório-alantóidea antes da extração de proteínas para retirada de resíduos de soro fetal bovino (SFB) (Miller *et al.*, 2006), duas proteínas presentes no SFB foram identificadas nesse estudo, *alpha-fetoprotein* (AFP) e *albumin protein* (ALB) e desta forma, foram excluídas das análises posteriores.

Ao avaliarmos as proteínas identificadas no experimento, foram observadas em praticamente todas elas alterações significativas nos valores de massa e pI em comparação aos valores preditos (Anexo 3). Essas diferenças mostram que as proteínas identificadas provavelmente sofreram modificações pós-traducionais (MPT) e isso pode justificar a não detecção de *spots* correspondentes para essas proteínas entre os géis comparados e a identificação de algumas proteínas em mais de um grupo experimental.

As proteínas identificadas foram inicialmente agrupadas por categoria funcional. No grupo controle (0,5 e 4 h) foram identificadas principalmente isoformas de proteínas relacionadas à biogênese de componentes celulares (*beta actin*, *cytokeratin 8*, *dynein light chain roadblock-type 1*, *F-actin-capping protein subunit beta*, *transgelin*), com função de ligação ou cofator mas também relacionadas à estrutura celular (*gelsolin isoform a*, *gelsolin isoform b*, *alpha-actinin-4*), proteínas relacionadas ao metabolismo (*3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1*, *3-hydroxyisobutirate dehydrogenase*, *inositol-3-phosphate syntase 1*, *prostaglandin reductase 2*, *transthyretin precursor*) e relacionadas ao envelhecimento, modificação e destino proteico (*activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1*, *cathepsin D*, *endoplasmin precursor*). É importante também ressaltar que a maior parte dos *spots* nos quais essas proteínas foram identificadas foram selecionados a partir da comparação entre os dois tempos do grupo controle. Em conjunto esses achados sugerem que as diferenças observadas do perfil de expressão de células trofoblásticas controle estão relacionadas à manutenção e estabilização da organização celular e adaptação ao cultivo celular após uma condição de estresse relacionada à abertura do útero, retirada da membrana cório-alantóidea e confecção dos explantes. Além disso, foram identificadas isoformas da

mesma proteína em diferentes *spots* com valores de massa diferentes entre elas e com alteração também em relação à massa predita, o que indica MPT dessas proteínas.

Em relação ao grupo de proteínas identificadas apenas em amostras de células trofoblásticas infectadas por *B. abortus* é interessante notar que várias categorias funcionais que não foram identificadas no grupo controle apareceram após a infecção. Proteínas com funções relacionadas ao Transporte celular, Defesa e virulência, Interação sistêmica com o ambiente, Síntese de proteínas, Energia e Comunicação celular e processamento de DNA foram identificadas somente em extratos proteicos de explantes de membrana cório-alantóidea infectados por *B. abortus* 2308, indicando que após a infecção foram ativados mecanismos de reconhecimento do patógeno e de respostas à infecção.

O estudo das interações preditas entre as proteínas identificadas em células trofoblásticas infectadas mostrou um perfil de expressão direcionado à recuperação da homeostase celular, seja estrutural ou metabólica, que pode ter sido comprometida pela infecção, e o desencadeamento de resposta inflamatória robusta.

Uma das mais interessantes associações observadas na rede de interação predita está relacionada às interações entre proteínas identificadas em células infectadas e proteínas da via de sinalização por TLR, componente do sistema imunológico inato.

Uma destas proteínas, a *Toll-interacting protein* (TOLLIP) foi identificada após 0,5 h de infecção por *B. abortus*. TOLLIP modula a sinalização via TLR e processos relacionados ao tráfego de membranas pela sua interação com proteínas e fosfoinositídeos. Controla a ativação de NF- κ B via MyD88 de duas maneiras: se associa

à IL-1R, TLR2 e TLR4 após ativação por LPS inibindo respostas imunológicas mediadas por TLR. Essa associação requer um domínio TLR-TIR intacto e sua região C-terminal incluindo o domínio CUE (*coupling of ubiquitin to endoplasmic reticulum degradation*). TOLLIP também se liga diretamente à IRAK-1, inibindo sua autofosforilação, mas sem promover a degradação de IRAK-1. Pode se ligar à IRAK-2 reforçando o papel redundante na sinalização dessa molécula em relação à IRAK-1 (Capelluto, 2011; Ciarrocchi *et al.*, 2009). Desta forma, a super-expressão de TOLLIP provoca a inibição da sinalização via TLR2, TLR4 e IL-1R o que mostra seu papel na modulação negativa da resposta imunológica (Capelluto, 2011).

Como TOLLIP é uma proteína que modula negativamente a resposta inflamatória, pode-se inferir que nas fases iniciais da infecção por *B. abortus* há uma tentativa de impedir uma resposta inflamatória robusta. Esse resultado está de acordo com os obtidos por Carvalho-Neta *et al.* (2008) que observou a redução da transcrição de genes associados à superfamília TNF (*Lynfotixin beta*, *Tumor necrosis factor ligand e Chemokine - C-X-C* motif) nas fases iniciais da infecção usando o mesmo modelo de explantes da membrana cório-alantóidea infectados por *B. abortus* 2308. Esse mesmo trabalho também demonstrou a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (CXCL6 e CXCL8) somente após 12 horas de infecção, ou seja, em fases mais tardias da infecção (Carvalho-Neta *et al.* 2008).

A identificação de TOLLIP no tempo de 0,5 h após a infecção de explantes de membrana cório-alantóidea por *B. abortus* 2308 corrobora com a idéia de que *Brucella* spp. é capaz de induzir um estado de imunossupressão nas fases iniciais da infecção subvertendo a sinalização por TLR para evadir da resposta imunológica inicial, passo importante para o estabelecimento da infecção. Um desses mecanismos de

subversão já foi descrito e ocorre pela produção da proteína TcpB que se liga diretamente à MyD88, impedindo dessa forma a sinalização via TLR e conseqüente inibição da resposta imunológica à infecção (Cirl *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2008).

Outra proteína que participa da sinalização via TLR é a *High-mobility group box 1-like* (HMGB1) que foi identificada nos dois tempos avaliados nesse estudo. Originalmente identificada como HMG-1, HMGB1 foi descrita como uma proteína ligante ao DNA com participação na manutenção da estrutura nuclear, regulação da transcrição de genes e moduladora da atividade de receptores de hormônio esteróides (Bianchi, 2009). Contudo, estudos recentes têm demonstrado sua importância como uma DAMP (*damage associated molecular patterns*), ou seja, HMGB1 participa da sinalização do perigo para outras células, ativa respostas imunológicas inata e adaptativa e promove a regeneração tecidual (Bianchi, 2009; Yang e Tracey, 2005). HMGB1 é um ligante endógeno de TLR (Sloane *et al.*, 2010; Pisetsky e Jiang, 2007; Park *et al.*, 2006) o que pode explicar a sua habilidade em induzir ativação celular e de respostas inflamatórias similares às iniciadas por LPS (Park *et al.*, 2006).

A identificação de HMGB1 nos dois tempos avaliados nesse estudo indica o direcionamento da resposta imunológica das células trofoblásticas infectadas para um perfil inflamatório, o que pode juntamente com outros mecanismos, culminar no desenvolvimento da placentite necrótica, principal lesão encontrada nos animais após o aborto (Thoen *et al.*, 1993; Xavier *et al.*, 2009). Apesar da observação da expressão de TOLLIP 0,5 h pós-infecção, que pode indicar regulação negativa da resposta imunológica no início da infecção de células trofoblásticas por *B. abortus*, a identificação de outra proteína que participa da sinalização por TLR nos dois tempos (0,5 h e 4 h) avaliados, indica que o perfil pró-

inflamatório prevalece e que a inibição inicial da resposta inflamatória ocorre em fases bem iniciais da infecção.

Várias proteínas identificadas em amostras infectadas estão relacionadas à produção de espécies de oxigênio reativo (ROS - *reactive oxygen species*) e de respostas inflamatórias induzidas pelo estresse oxidativo. Em contrapartida, também foram identificadas proteínas antioxidantes implicadas com a proteção tecidual.

Aldose reductase (AKR1B1), identificada nos tempos de 0,5 h e 4 h após a infecção por *B. abortus* é uma proteína primariamente relacionada à catalisação da redução de glicose à sorbitol, o primeiro passo da via dos polióis do metabolismo da glicose (Yadav *et al.*, 2009). Vários trabalhos também têm demonstrado a relação entre AKR1B1 e a produção de ROS ocasionando respostas inflamatórias induzidas pelo estresse oxidativo.

Outra proteína identificada em células infectadas e que pode contribuir para estresse oxidativo e dano tecidual é a NADH *dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8* (NDUFS8). Essa proteína foi identificada após 4 h de infecção por *B. abortus* e é uma subunidade da NADH *dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein*, também chamada Complexo I ou NADH *ubiquinone oxireductase*. O Complexo I é um importante ponto de entrada para os elétrons da cadeia respiratória e fonte celular significativa de ROS, como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, que provocam danos teciduais com alteração da sinalização celular e desenvolvimento de processos patológicos (Yadav *et al.*, 2009; Pryde e Hirst, 2011).

A identificação de proteínas relacionadas com produção de ROS pode indicar o início da resposta do hospedeiro à infecção por *B. abortus*. A explosão oxidativa é um dos mecanismos de resposta imunológica inata e

na infecção por *B. abortus* está relacionada à diminuição do número de bactérias intracelulares (Jiang *et al.*, 1993). Por outro lado, *Brucella* spp. é capaz de produzir a enzima superóxido dismutase (SOD) que a protege contra superóxidos endógenos produzidos pelo metabolismo aeróbico e contra a explosão respiratória da célula hospedeira. A produção de SOD evita a morte bacteriana e possibilita o estabelecimento e manutenção da bactéria no nicho intracelular, sendo desta forma, importante para a sobrevivência de *Brucella* spp. (Seleem *et al.*, 2007).

Em contrapartida, proteínas relacionadas à citoproteção contra o estresse oxidativo foram também identificadas em explantes de membrana cório-alantóida infectados por *B. abortus*. A produção dessas proteínas diminui os efeitos danosos do ROS que pode provocar a morte celular, mas em contrapartida, pode contribuir para a sobrevivência intracelular de *Brucella* spp.

Biliverdin reductase (BVR) é responsável por um poderoso ciclo de redução com a conversão de bilirrubina à biliverdina. A produção de bilirrubina continuamente protege as células contra o estresse oxidativo, condição em que o equilíbrio entre os compostos anti e pró-oxidativos é quebrado, sendo considerada a bilirrubina o maior citoprotetor fisiológico (Florczyk *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2011).

Outra proteína com papel importante no controle da produção de ROS é a *Thioredoxin-dependent peroxide reductase* (PRDX3 – *Peroxiredoxin* 3). Essa proteína faz parte da família das peroxirredoxinas (Prxs), enzimas antioxidantes que regulam o nível intracelular de H₂O₂ e que por isso, estão implicadas com a proteção tecidual contra o estresse oxidativo e vias de sinalização mediada por H₂O₂ (Wood *et al.*, 2003).

Nesse estudo também foram identificadas proteínas que podem estar associadas ao redirecionamento do tráfego intracelular e ao bloqueio da fusão dos fagossomos com os endossomos e lisossomos, impedindo assim a degradação bacteriana (Gorvel e Moreno, 2002), sendo, por isso, um dos principais mecanismos de sobrevivência de *Brucella* spp.

Secretory carrier-associated membrane protein 2 (SCAMP2) foi identificada após 0,5 h de infecção e faz parte de um grupo de proteínas transmembrânicas que participa do tráfego de vesículas (Toyooka e Matsuoka, 2009) e que também desempenha papel na exocitose (Liu *et al.*, 2002) e endocitose (Fernandez-Chacon e Südhof, 2000). As SCAMP são um grupo de proteínas transmembrânicas expressas ubiquosamente na maioria das células de organismos eucariotas e que participam do tráfego de vesículas entre o Aparato de Golgi e a membrana plasmática (Toyooka e Matsuoka, 2009). Estão presentes na superfície de membranas de várias organelas, como no Aparato de Golgi, nas redes *trans*-Golgi, endossomos de reciclagem, vesículas sinápticas e na membrana plasmática (Liu *et al.*, 2002) e desempenham papel na exocitose (Liu *et al.*, 2002) e endocitose (Fernandez-Chacon e Südhof, 2000). Especificamente SCAMP2 é capaz de se ligar a Arf6, uma GTPase que participa do tráfego entre endossomos de reciclagem e a superfície da células (Diering e Church, 2008; Liu *et al.*, 2005).

A proteína Rab11a GTPase (*ras-related protein* Rab 11A – RAB11A) foi identificada apenas no gel de amostras após 4 h de infecção. Proteínas Rab são trifosfatases de guanosina (*small* GTPases) que têm papel fundamental no transporte e fusão de membrana (Jordens *et al.*, 2005). Uma possível associação entre Rab11A e ativação de expressão de citocinas e controle do tráfego de TLR4 para fagossomos contendo bactérias Gram-negativa foi

demonstrado por Husebye *et al.* (2010). Os autores descreveram uma via de tráfego para TLR4 do compartimento endocítico de reciclagem (ERC) para fagossomos contendo *E. coli*. Demonstraram uma forte co-localização entre TLR4 e Rab11A no ERC e o envolvimento de Rab11A no recrutamento de TLR4 para fagossomos em um processo que requer sinalização de TLR4. Além disso, a molécula adaptadora TRAM e IRF3 (*interferon regulatory transcription factor 3*) foram necessários para a internalização de *E. coli* e para uma robusta indução de produção de INF- β . A supressão de Rab11A reduziu TLR4 no ERC e em fagossomos levando à inibição da via de sinalização IRF3 induzida por *E. coli*, enquanto a ativação do fator de transcrição NF- κ B não foi afetado. Desta forma, os autores mostraram que Rab11A é um importante regulador do transporte de TLR4 e TRAM para os fagossomos de *E. coli* além de controlar a ativação de IRF3, que na infecção por *B. abortus*, induz a produção de INF- β na resposta à infecção via MyD88 (De Almeida *et al.*, 2011).

Várias outras proteínas foram identificadas apenas em amostras de células trofoblásticas infectadas por *B. abortus*.

Complement component 1Q subcomponent-binding protein (C1QBP), também designada de gC1q-R, é uma proteína multicompartimental de 33 kDa de cadeia única, altamente ácida e expressa em vários tipos de células e tecidos. Inicialmente foi identificada em preparações de membranas de células Raji (linhagem contínua de linfócitos B) (Ghebrehiwet *et al.*, 1994) e seu papel como proteína ligante à cabeça globular de C1q, com inibição da ativação da fração C1 do complemento, foi demonstrada (Ghebrehiwet *et al.*, 1994; Peterson *et al.*, 1997). É predominantemente intracelular encontrada em associação com a mitocôndria e núcleo, mas fortes evidências indicam que gC1q-R pode ser expressa na superfície celular (Ghebrehiwet *et al.*, 2001)

onde pode se ligar à proteínas do plasma ou de microrganismos, à proteínas dos sistema de coagulação como trombina, fibrinogênio, vitronectina e à proteínas de alto peso molecular como kininogênio. Evidências também sugerem sua ligação às proteínas de superfície de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* (proteína A) e *Listeria monocytogenes* (intenalina B – InlB), além de no interior das células, ser capaz de se ligar ao receptor α_{1B} -adrenérgico e à proteína quinase C (PKC). Em adição, a expressão de gC1q-R pode ser ativada pela ação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α ou pelo LPS (Ghebrehiwet e Peerschke, 1998). Desta forma, embora originalmente isolado como um receptor de C1q em virtude de sua especificidade para a cabeça globular dessa molécula, evidências demonstram que gC1q-R pode servir como um receptor para ligantes diversos sugerindo que gC1q-R desempenha um papel importante na coagulação do sangue, inflamação e infecção (Ghebrehiwet *et al.*, 2002; Ghebrehiwet *et al.*, 1994).

Adenosylhomocysteinase (AHCY) é uma enzima homotetramérica altamente conservada de 432 aminoácidos que catalisa a hidrólise reversível de *S-Adenosyl-L-homocysteine* (AdoHcy) a adenosina (Ado) e homocisteína (Hcy). A AdoHcy é resultante de todas as reações de transmetilação de de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) envolvidas em uma série de processos fisiológicos muito importantes, incluindo a maioria das metilações de proteínas (Banerjee, 1980), lipídios (Ueland *et al.*, 1984), ácidos nucleicos (Chiang *et al.*, 1996), e de pequenas moléculas (Yuan *et al.*, 1999). Após a desmetilação, AdoMet é convertido em S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy), que funciona como um inibidor potente de transmetilações por mecanismos de *feedback*. O bloqueio de AHCY, provoca o acúmulo substancial de AdoHcy que é um inibidor competitivo da fosfatidil inositol kinase, que está diretamente envolvido no receptor da célula T e na segunda mensagem

de sinalização, incluindo o fluxo de intracelular cálcio (Berridge, 1987; Pike e DeMeester, 1988; Berridge e Irvine, 1989). Além disso, a ativação e proliferação de linfócitos depende das reações de transmetilação dependentes de AHCY (German *et al.*, 1983; Saso *et al.*, 2001). Desta forma, AHCY tem sido identificada como uma enzima chave da resposta imunológica da célula e o uso de substâncias inibidoras com fins terapêuticos no tratamento de doenças inflamatórias e imunológicas está sendo estudado, já que sua inibição está associada à estados de imunossupressão (Saso *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005).

AHCY foi a única proteína que obteve *Match* com o banco de dados de *Bos taurus* e *Brucella abortus*. Desta forma, é possível que essa proteína tenha sido expressa por *B. abortus* durante a infecção em células trofoblásticas. Outra possibilidade é a observação da mesma proteína expressa células bovinas e pela bactéria. O que deve ser observado é que o resultado da busca no banco *Bos taurus* gerou a identificação de sete peptídeos com valor de escore alto (378 – 17% de cobertura) enquanto a busca no banco de dados de *Brucella* identificou apenas 1 peptídeo com valor de escore baixo (61 – 4% de cobertura). Esse resultado indica maior probabilidade da proteína ter sido expressa pelos trofoblastos bovinos, mas por outro lado, pode indicar também maior quantidade da proteína produzida por *B. taurus* do que por *B. abortus*.

O papel imunogênico de AHCY expresso por *B. abortus* foi demonstrado por Yang *et al.* (2010). Esses autores observaram aumento significativo da produção de IFN- γ e IL-2 em camundongos BALB/c inoculados com AHCY recombinante de *B. melitensis* e posteriormente desafiados com *B. melitensis* 16M. Após 4 semanas do desafio foi observado nível alto de proteção contra *B. melitensis* 16M indicando que AHYC poderia ser um candidato útil para o

desenvolvimento de subunidade de vacinas contra a *B. melitensis* (Yang *et al.*, 2010). Além disso, os autores mostraram que AHCY é uma proteína conservada entre as espécies de *Brucella* e que apresenta similaridade de 99,7% na composição de aminoácidos, o que sugere seu uso no desenvolvimento de vacinas contra infecções por *Brucella* spp. (Yang *et al.*, 2010).

Abhydrolase domain-containing protein 14B (ABHD14B) pertence à família das ABHD14 que por sua vez, se inclui na superfamília das hidrolases. Por apresentar a dobra alfa/beta das hidrolases, que é um domínio catalítico encontrado em uma ampla série de enzimas, provavelmente possui atividade de hidrolase (Ding *et al.*, 2011). A atividade de hidrolase sobre o p-nitrofenil butirato (éster de cadeia carbônica curta) *in vitro* tem sido demonstrada. Por interagir com TAF-1 (*Transcription initiation factor TFIID subunit 1*), proteína que coordena mais de 70 polipeptídeos envolvidas na iniciação da transcrição pela RNA polimerase, pode estar relacionada à transcrição. É uma proteína ubiquosamente distribuída, tendo sido sua expressão detectada no baço, timo, próstata, testículo, ovário, placenta, intestino delgado, cólon, coração, fígado, rins, pâncreas, músculo esquelético e coração. Porém, sua função ainda não foi determinada e não são conhecidas informações a respeito do seu papel fisiológico e de substratos biológicos.

Malate dehydrogenase 1 (MDH1), a forma citosólica da enzima *Malate dehydrogenase* (MDH), catalisa a conversão reversível do malato para oxaloacetato no citoplasma. As função primária MDH1 no metabolismo é o transporte de equivalentes de NADH e metabólitos através da membrana mitocondrial e o controle do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Desta forma, desempenha papel crítico no controle do equilíbrio da energia entre a mitocôndria e citoplasma (Lo *et al.*, 2007). Além disso,

MDH1 é capaz de ativar p53, que é um fator de transcrição bem documentado relacionado ao controle do ciclo celular, reparo de DNA e morte celular e que, em última análise contribui para a manutenção da estabilidade genômica. Em condições de depleção de glicose MDH1 diretamente regula a apoptose celular via p53 (Lo *et al.*, 2007).

Outra proteína relacionada à modulação dos mecanismos de apoptose celular é a *Galectin 7* (LGALS7) que foi identificada em células trofoblásticas no tempo de 0,5 h após infecção.

LGALS7 faz parte da família de galectinas que são proteínas evolutivamente conservadas que se ligam à carboidratos e que são expressas intra e extracelularmente e embora tenham características de proteínas citosólicas, são secretados por vias não-clássicas (não-ER-Golgi). Extracelularmente, as galectinas podem se ligar a glicoconjugados da superfície celular que contenham galactose disponível. A expressão das galectinas é modulada durante a diferenciação e ativação de células de resposta imunológica e muda de acordo com condições fisiológicas e patológicas (Rabinovich e Gruppi, 2005). Especificamente a LGALS7 tem sido relacionada à apoptose. Células que super-expressam LGALS7 exibem atividade pró-apoptótica pela ativação de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) e liberação do citocromo c mitocondrial (Villeneuve *et al.*, 2011; Kuwabara *et al.*, 2001; Bernerd *et al.*, 1999).

Também relacionada com os mecanismos de reconhecimento de patógenos e respostas imunológicas *Protein disulfide isomerase A3* (PDIA3) foi identificada nos dois tempos após a infecção por *B. abortus*. Também chamada ERp57, é uma proteína dissulfeto isomerase (PDI) que pertence à superfamília de enzimas tiol-oxiredutases e foi identificada nos dois tempos pós-infecção por *B. abortus*. As PDI são consideradas

proteínas essenciais à sobrevivência celular e a diminuição da sua expressão pode comprometer a viabilidade celular. Além da catalização de reações de isomerização e de agirem como chaperonas, as PDI parecem estar relacionadas a outras várias funções associadas à interação hospedeiro-patógeno (Stolf *et al.*, 2011). Estudos demonstram a associação dessas proteínas com adesão e internalização de patógenos, processamento de antígenos RE/fagossomo e regulação da produção de ROS pela NADPH oxidase, considerada umas das principais fontes geradoras de espécies de oxigênio reativo (Stolf *et al.*, 2011). PDIA3 especificamente está associada à apresentação de peptídeos via MHC classe I juntamente com outras proteínas do retículo endoplasmático (Wearsch e Cresswell, 2007) e sua super-expressão foi recentemente relacionada aos processos imunológicos observados na síndrome do intestino irritável (Ding *et al.*, 2010).

Calmodulin (CALM) é a principal proteína ligante ao Ca^{2+} encontrada em todas as células eucarióticas. O complexo CALM- Ca^{2+} desencadeia sinais para muitos eventos celulares essenciais pois é capaz de controlar as atividades de mais de 40 proteínas e enzimas diferentes, dentre elas quinases e fosfatases (Yao e Squier, 1996). CALM é o segundo mensageiro que tem que traduzir todo aumento modesto de cálcio intracelular em uma resposta fisiológica em todas as células eucarióticas. Diferentes funções podem ser desempenhadas por CALM como a síntese e degradação de nucleotídeos, transcrição de genes, regulação de diferentes sistemas de transporte, controle do metabolismo celular, organização do citoesqueleto, citocinese, contração muscular, regulação do volume osmótico, endocitose e exocitose, fertilização do zigoto, comunicação intercelular, proliferação celular, diferenciação e apoptose (Vogel *et al.*, 1994).

Proactivator polypeptide precursor (PSAPL1), também chamada *Prosaposin* (PSAP), é uma glicoproteína lisossomal altamente conservada precursora de 4 pequenos peptídeos após sua clivagem: Saponina A, B, C e D. Cada domínio da proteína precursora possui aproximadamente 80 resíduos de aminoácidos e possuem a mesma localização dos resíduos de cisteína e dos sítios de glicosilação. As saponinas localizam-se primariamente no compartimento lisossomal onde facilitam o catabolismo de glicosfingolípídeos com pequenos grupamentos oligossacarídeos. A proteína precursora existe como proteína secretada e como proteína integral de membrana. A degradação lisossomal de esfingolípídeos ocorre por ações sequenciais de hidrolases específicas e algumas dessas enzimas para agirem precisam de proteínas não enzimáticas de baixo peso molecular, as prosaposinas (Kishimoto *et al.*, 1992).

PSAPL1 desempenha duas funções principais: como proteína lisossomal ela é precursora das saposinas A-D envolvida na hidrólise lisossomal de esfingolípídeos. Várias proteínas lisossomais, particularmente as PSAPL1, promovem a ligação de lípidios à CD1d sendo a Saposina B a mais eficiente, embora todas as quatro possam promover essa ligação. A massa predita de PSAP é de 58 kDa, porém a massa experimental foi de quase 14 kDa, o que pode significar que foi identificada a proteína na sua forma clivada (saponina) e ativa (Kishimoto *et al.*, 1992).

Com função semelhante, foi identificada em amostras infectadas por *B. abortus* nos dois tempos avaliados a proteína *Beta hexominidase subunit beta preproprotein* (HEXB) que é a subunidade beta da enzima lisossomal β -N-acetyl-hexosaminidase que clivam resíduos de *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilgalactosamina de vários glicoconjugados, incluindo glicoproteínas, oligossacarídeos, glicosfingolípídeos como

GM2 e seu derivado do asialo e globosídeo (Magini *et al.*, 2008).

Nesse estudo também foram identificadas apenas em amostras infectadas proteínas com funções estruturais. *Keratin 7* (KRT7) e *Keratin 14* (KRT14) foram identificadas nos dois tempos pós-infecção avaliados.

KRT7 e KRT14 são citoqueratinas constituintes do citoesqueleto das células epiteliais. A KRT14 é uma citoqueratina tipo I que é encontrada usualmente como um heterodímero com duas moléculas da KRT5, uma queratina tipo II, para formar o citoesqueleto de células epiteliais. Os filamentos KRT5-KRT14 se auto-organizam em grandes feixes e melhoram as propriedades mecânicas envolvidas na resistência dos filamentos intermediários de queratina *in vitro*.

KRT7 é uma citoqueratina tipo II, com propriedades básicas ou neutras e expressas especificamente no epitélio simples revestindo cavidades de órgãos internos e em ductos de glândulas e vasos sanguíneos. Bloqueia a intérfase dependente de IFN e estimula a síntese de DNA nas células (Bouwens, 1998). Além disso, está envolvida na regulação da tradução do RNAm do papilomavírus humano tipo 16 E7 (HPV16 E7) (Langbein *et al.*, 1999; Kanduc, 2002).

Outra proteína relacionada à organização estrutural e estrutura celulares identificada nas amostras infectadas foi *Tropomyosin 4* (TPM4). Essa proteína foi identificada nos dois tempos avaliados e é um membro da família tropomiosina de proteínas ligantes à actina envolvidas no sistema de contração de músculos lisos e estriados e relacionada ao citoesqueleto de células não musculares. Em células não musculares, como as células trofoblásticas, estão implicadas na estabilização dos filamentos de actina do citoesqueleto (Vlahovich *et al.*, 1998).

Heat shock protein beta-1 (HSPB1) ou Hsp27 é uma proteína pertencente à família *small heat shock proteins* (sHsp), presentes em todos os organismos e relacionadas às respostas ao estresse. Nessa família estão incluídas 9 sHsp cujo tamanho varia de 15 a 30 kDa (Hsp27, HspB3, HspB8, HspB9, MKBP/HspB2, cvHsp, α -A *crystallin* e α -B *crystallin*) (Kostenko e Moens, 2009).

HSPB1 atua como chaperona de maneira independente de ATP no desdobramento de proteínas, mas também está implicada na arquitetura do citoesqueleto, migração celular, metabolismo, sobrevivência celular, crescimento/diferenciação, estabilização do RNA mensageiro e progressão de tumores (Concannon *et al.*, 2003).

Diferentes papéis desempenhados por HSPB1 durante o estresse celular têm sido descritos e estão relacionados aos efeitos citoprotetores observados com o aumento da sua expressão. HSPB1 funciona como chaperona auxiliando a estabilizar os peptídeos com erro de enovelamento ou não enovelados, possibilitando a célula reparar as proteínas danificadas; pode interferir com mecanismos de ativação de caspases inibindo a apoptose; na modulação do estresse oxidativo e regulação do citoesqueleto pela estabilização dos microfilamentos de F-actina e do citoesqueleto, prevenindo desta forma, a desagregação celular (Concannon *et al.*, 2003; Lanneau *et al.*, 2008).

Por fim, foram identificadas apenas também em amostras infectadas as proteínas *Aldose 1-epimerase* (GALM) e *Ornithine aminotransferase* (OAT).

GALM ou galactose mutarotase é uma enzima que catalisa a interconversão de β -D-galactose a α -D-galactose, essencial para o metabolismo normal da galactose pela manutenção do equilíbrio de α e β anômeros da galactose e também para a produção de oligossacarídeos complexos

(Timson e Reece, 2003; Holden *et al.*, 2003). Embora a proteína GALM tenha sido bem estudada, a regulação da sua expressão não foi ainda descrita. Um dos poucos estudos avaliando sua regulação mostrou que em células mielóides humanas (THP-1) o tratamento com ácido retinóico aumentou de maneira rápida e robusta a expressão de GALM e de outros genes relacionados ao metabolismo da galactose, o que pode afetar a utilização de energia e síntese de glicoproteínas ou glicolípídeos da superfície celular envolvidos na motilidade, adesão e outras propriedades funcionais (Pai *et al.*, 2007). O ácido retinóico por sua vez, tem múltiplos efeitos relacionados à progressão do ciclo celular e seu papel na diferenciação das células THP-1 é bem descrita, aumentando funções imunológicas dessas células. O aumento da expressão de GALM é descrita na uveíte equina recorrente (URE), doença de características autoimune e também associado à processos inflamatórios (Hauck *et al.*, 2007).

OAT é uma enzima reversível da matrix mitocondrial que cataliza a transaminação reversível da ornitina em glutamato semi-aldeído expressa em todos os tecidos mas principalmente no fígado, rins e intestino (Mitchell *et al.*, 1988). A enzima no seu estado maduro é um homopolímero formado por 4 ou 6 monômeros. Os monômeros são sintetizados nos ribossomos livres do citoplasma como precursores de 40 kDa que são clivados em peptídeos de 45 kDa na mitocôndria (Mitchell *et al.*, 1988). Sua expressão varia com o tecido e com circunstâncias fisiológicas e pode estar relacionada ao catabolismo da arginina, biossíntese da prolina ou mesmo da biossíntese *de novo* da ornitina (Ventura *et al.*, 2010; Ventura *et al.*, 2009).

O presente trabalho foi, de maneira geral, um estudo de triagem realizado objetivando a identificação de proteínas que pudessem ter papel relevante na resposta das células trofoblásticas à infecção por *B. abortus*. É o

ponto de partida para novas investigações direcionadas a uma melhor compreensão sobre a relação bactéria-hospedeiro e dos mecanismos relacionados ao aborto observado na brucelose bovina. Proteínas identificadas neste trabalho podem ser desta forma, foco de novos estudos.

8 - CONCLUSÕES

1 - Os perfis de expressão de células trofoblásticas bovinas não infectadas e infectadas por *B. abortus* apresentam similaridade alta nas fases iniciais da infecção.

2 - A infecção por *Brucella abortus* 2308 não induziu aumento ou diminuição da expressão de proteínas comuns entre células trofoblásticas bovinas infectadas e não infectadas em decorrência da infecção, nas condições e modelo usados. Por outro lado, a infecção por *B. abortus* induz a expressão de proteínas ou isoformas de proteínas não produzidas por células não infectadas.

3 - A análise diferencial da expressão de proteínas e o estudo de predição das interações entre as proteínas identificadas apenas em células trofoblásticas bovinas infectadas por *B. abortus* mostrou um perfil de expressão direcionado à manutenção da homeostase metabólica e estrutural, e também direcionado à resposta imunológica do hospedeiro à infecção. As proteínas BLVRA, LGALS7, RPLP1, SCAMP2, TOLLIP, GALM, AHCY, PSAPL1/PSAP, OAT, C1QBP, NDUFS8, PRCII, RAB11A, CALM1, MDH1, PRDX3, ABHD14B, KRT14, KRT7, HMGB1, HEXB, AKR1B1, PDIA3 e TPM4 foram identificadas apenas nos extratos proteicos de células trofoblásticas infectadas.

4 - Proteínas identificadas nesse estudo serão alvos de novas pesquisas visando o melhoramento do entendimento dos mecanismos relacionados ao aborto provocado pela infecção por *B. abortus* em bovinos.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003. 3v. (Scientific and Technical Publication, 580).
2. AEBERSOLD, R. Quantitative proteome analysis: methods and applications. *J Infect Dis.* v.187, p.315-20, 2003.
3. AL DAHOUK, S.; JUBIER-MAURIN, V.; SCHOLZ, H.C.; TOMASO, H.; KARGES, W.; NEUBAUER, H.; KÖHLER, S. Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics.* v.8, n.18. p.3862-3870, 2008.
4. AL DAHOUK, S.; LOISEL-MEYER, S.; SCHOLZ, H.C.; TOMASO, H.; KERSTEN, M.; HARDER, A.; NEUBAUER, H.; KÖHLER, S.; JUBIER-MAURIN, V. Proteomic analysis of *Brucella suis* under oxygen deficiency reveals flexibility in adaptive expression of various pathways. *Proteomics.* v.9, p.3011-3021, 2009.
5. ALLAN, G.; CHAPPEL, R.; WILLIAMSON, P.; McNAUGHT, D. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg.*, v. 76, p.287-298, 1976.
6. ALTON G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 188p.
7. ANDERSON, T.; CHEVILLE, N.F. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am J Pathol.* v.124(2), p.226-237, 1986.
8. 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, 1986.
9. ANSELMO, F.P.; PAVEZ, M.M. *Diagnóstico de saúde animal*. Brasília: Ministério da Agricultura, 1977. 735p.
10. BANERJEE, A.K. 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Ver*, v.44, p.175-205, 1980.
11. BEER, J. Doenças Infecciosas em animais domésticos. São Paulo: Roca, 1999. p163-178.
12. BEH, K. J. Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet. Sci.*, v.17, p.1-4, 1974.
13. BERNERD, F.; SARASIN, A.; MAGNALDO, T. Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.96(20), p.11329-11334, 1999.
14. BERRIDGE, M.J Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem.* v.56, p.159-193, 1987.
15. BERRIDGE, M.J.; IRVINE, R.F. Inositol phosphates and cell

- signalling. *Nature (Lond)*. v.341, p.197-205, 1989.
16. BIANCHI, M.E. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol*. v.86(3), p.573-576, 2009.
 17. BOSCHIROLI, M.L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*. v.4(1), p.58-64, 2001.
 18. BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; ALLARDET-SERVENT, A.; CAZEVIEILLE, C.; LAVIGNE, J.P.; LIAUTARD, J.P.; RAMUZ, M.; O'CALLAGHAN, D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol*. v.90(1-4), p.341-8, 2002.
 19. Bovine Brucellosis. In: MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines. 6.ed. Paris: OIE/WHO, 2008. p.624-659.
 20. BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6 de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jan. 2004, Seção 1, p.6-10. 2004.
 21. BREW, S.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; MACMILLAN, A.P.; STAUNTON, N.J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec*. v.144(17), p.483, 1999.
 22. BRICKER, B. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Vet. Microb*. v.90, p.433-434, 2002.
 23. 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.
 24. BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol*. v.33(6), p.1640-1642, 1995.
 25. BRIDGER, P.S.; HAUPT, S.; KLISCH, K.; LEISER, R.; TINNEBERG, H.R.; PFARRER, C. Validation of primary epitheloid cell cultures isolated from bovine placental caruncles and cotyledons. *Theriogenology*. v.68(4), p.592-603, 2007.
 26. BUDDLE, M B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg (Lond)*. v.54(3), p.351-364, 1956.
 27. BUDDLE, M.B.; BOYES, B.W. *Aust. Vet. J*. v.29, p.145, 1953.
 28. CAMPBELL, G.A.; ADAMS, L.G.; SOWA, B.A. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*. v.41(3-4), p.295-306, 1994.
 29. CAMPOS, M. A.; ROSINHA, G. M. S.; ALMEIDA, I. C.; SALGUEIRO, X. S.; JARVIS, B. W.; SPLITTER, G. A.; QURESHI, N.; BRUNAROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Role of toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect.Immun.*, v.72 (1), p.176-186, 2004.

30. CANDIANO, G.; BRUSHI, M.; MEUANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteoma analysis. *Electrophoresis*, v.25, p.1327-1333, 2004.
31. CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect*. v.45(2), p.122-127, 2002.
32. CAPELLUTO, G.S. Tollip: a multitasking protein in innate immunity and protein trafficking. *Microbes and Infection*. v.14(2), p.140-147, 2011.
33. CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.*, v.5, p.1-13, 2006.
34. CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis: isolation, diagnosis, transmission. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*. v.71, p.517-527, 1967.
35. CAROFF, M.; BUNDLE, D.R.; PERRY, M.B. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur J Biochem*. v.139(1), p.195-200, 1984.
36. CARVALHO-NETA, A. V.; STEYNEN, A. P. R.; PAIXAO, T. A.; MIRANDA, K. L.; SILVA, F. L.; ROUX, C. M.; TSOLIS, R. M.; LEWIN, H. A.; ADAMS, L. G.; CARVALHO, A. F. ; LAGE, A. P. ; SANTOS, R. L. Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, v.76, p.1897-1907, 2008.
37. CARVALHO-NETA, A.V.B; MOL, J.P.S.; XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*. v.184, p.146-155, 2010.
38. CELLI, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol*. v.157(2), p.93-98, 2006.
39. CELLI, J.; GORVEL, J.P. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol*. v.7(1), p.93-97, 2004.
40. CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M.; PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*. v.198(4), p.545-556, 2003.
41. CHAIN, P.S.; COMERCI, D.J.; TOLMASKY, M.E.; LARIMER, F.W.; Malfatti, S.A.; VERGEZ, L.M.; AGUERO, F.; LAND; M.L.; UGALDE; R.A.; GARCIA, E. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun*. v.73, p.8353-8361, 2005.
42. CHIANG, P.K.; GORDON, R.K.; TAL, J.; ZENG, G.C.; DOCTOR, B.P.; PARDHASARADHI, K.; MCCANN, P.P. S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*. v.10, p.471-480, 1996.
43. CIARROCCHI, A.; D'ANGELO, R.; CORDIGLIERI, C.; RISPOLI, A.; SANTI, S.; RICCIO, M.; CARONE, S.; MANCIA, A.L.; PACI, S.; CIPOLLINI, E.; AMBROSETTI, D.; MELLI, M. Tollip is a mediator of protein sumoylation. *PLoS One*. v.4(2), p.e4404, 2009.

44. CIRL, C.; WIESER, A.; YADAV, M.; DUERR, S.; SCHUBERT, S. R.; FISCHER, H.; STAPPERT, D.; WANTIA, N.; RODRIGUEZ, N.; WAGNER, H.; SVANBORG, C.; MIETHKE, T. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature*, v.14, p.399-406, 2008.
45. CONCANNON, C.G.; GORMAN, A.M.; SAMALI, A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*. v.8(1),p.61-70, 2003.
46. CONNOLLY, J.P.; COMERCI, D.; ALEFANTIS, T.G.; WALZ, A.; QUAN, M.; CHAFIN, R.; GREWAL, P.; MUJER, C.V.; UGALDE, R.A.; DELVECCHIO, V.G. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics*. v.6, p.3767-3780, 2006.
47. CORBEIL, L. B.; BLAU, K.; INZANA, T. J.; NIELSEN, K. H.; JACOBSON, R. H.; CORBEIL, R. R.; WINTER, A. J. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun.*, v.56, p.3251-3261, 1988.
48. CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.195-215.
49. CRAWFORD, R.P., HUBER, J.D., ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. (Eds.), *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, USA, p.131-151, 1990.
50. CUTLER, S.J.; WHATMORE, A.M.; COMMANDER, N.J. Brucellosis--new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol.* v.98(6), p.1270-1281, 2005.
51. DE ALMEIDA, L.A.; CARVALHO, N.B.; OLIVEIRA, F.S.; LACERDA, T.L.; VASCONCELOS, A.C.; NOGUEIRA, L.; BAFICA, A.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, S.C. MyD88 and STING Signaling Pathways Are Required for IRF3-Mediated IFN- β Induction in Response to *Brucella abortus* Infection. *PLoS One.* v.6(8), e23135, 2011.
52. DAWSON, C.E.; PERRETT, L.L.; YOUNG, E.J.; DAVISON, N.J.; MONIES, R.J. Isolation of *Brucella* species from a bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Vet Rec.* v.158(24), p.831-832, 2006.
53. DE JONG, M.F.; ROLÁN, H.G.; TSOLIS, R.M. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. *Cell Microbiol.* v.12, p.1195-1202, 2010.
54. DELPINO, M.V.; COMERCI, D.J.; WAGNER, M.A.; ESCHENBRENNER, M.; MUJER, C.V.; UGALDE, R.A.; FOSSATI, C.A.; BALDI, P.C.; DELVECCHIO, V.G. Differential composition of culture supernatants from wild-type *Brucella abortus* and its isogenic virB mutants. *Arch Microbiol.* v.191, p.571-581, 2009.
55. DELVECCHIO, V. G.; WAGNER, M.A.; ESCHENBRENNER, M.; HORN, T.A.; KRAYCER, J.A.; ESTOCK, F.; ELZER, P.; MUJER, C.V. *Brucella* proteomes – a review. *Vet. Microbiol.* v.90, p.593-603, 2002.
56. DETILLEUX, P.G.; DEYOUE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet. Pathol.*, v.27, p.317-328, 1990.

57. DIERING, G.H.; CHURCH, J.; NUMATA, M. Secretory Carrier Membrane Protein 2 Regulates Cell-surface Targeting of Brain-enriched Na⁺/H⁺ Exchanger NHE5. *the journal of biological chemistry*. v.284(20), p.13892–13903, 2009.
58. DING, X.; YANG, J.; WANG, S. Antisense Oligonucleotides Targeting Abhydrolase Domain Containing 2 Block Human Hepatitis B Virus Propagation. *Oligonucleotides*. v.21(2), p.77-84, 2011.
59. DING, Y.; LU, B.; CHEN, D.; MENG, L.; SHEN, Y.; CHEN, S. Proteomic analysis of colonic mucosa in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proteomics*, v.10, p.2620-2630, 2010.
60. DUEÑAS, A. I.; ORDUNA, A.; CRESPO, M. S.; GARCIA-RODRIGUEZ, C. 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.
61. EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus*. *Vet Bull*, v.62, p.743-775, 1992.
62. ESCHENBRENNER, M.; HORN, T.A.; WAGNER, M.A.; MUJER, C.V.; MILLER-SCANDLE, T.L.; DELVECCHIO, V.G. Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M. *J Proteome Res*. v.5, p.1731-1740, 2006.
63. EVANS, H.E.; SACK, W.O.; Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references *Zentralbl Veterinarmed*, v.2(1), p.11-45, 1973.
64. EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; MARTIN, B.M.; CUMMINS, D.R.; MILLER, W.G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest*. v.6(4), p.448-452, 1994.
65. FERNANDEZ-CHACON, R.; ACHIRILOAIE, M.; JANZ, R., ALBANESI, J. P.; SUDHOF, T.C. SCAMP1 function in endocytosis. *J Biol Chem*. v.275(17), p.12752-12756, 2000.
66. FERREIRA, A.J.; FERREIRA, C. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. p.125-143.
67. FICHT, T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol.* v.5(6), p.859-866, 2010.
68. FLORCZYK, U.M.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J. Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacol rep.* v.60, p.38-48, 2008.
69. FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* v.57(Pt 11), p.2688-2693, 2007.
70. FOSTER, G.; MACMILLAN, A.P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H.M.; CLOECKAERT, A.; REID, R.J.; BREW, S.; PATTERSON, I.A. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis

- on isolates from Scotland. *Vet Microbiol.* v.90(1-4), p.563-580, 2002.
71. FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J.P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Expert Rev Mol Med.* v.9(35), p.1-10, 2007.
 72. GERMAN, D.C.; BLOCH, C.A.; KREDICH, N.M. Measurements of S-adenosylmethionine and L-homocysteine metabolism in cultured human lymphoid cells. *J Biol Chem.* v. 258, p.10997-11003, 1983.
 73. GHEBREHIWET, B.; JESTY, J.; PEERSCHKE, E.I. gC1q-R/p33: structure-function predictions from the crystal structure. *Immunobiology.* v.205(4-5), p.421-432, 2002.
 74. GHEBREHIWET, B.; LIM, B.L.; KUMAR, R.; FENG, X.; PEERSCHKE, E.I. gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartamental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol Rev.* v.180, p.65-77, 2001.
 75. GHEBREHIWET, B.; LIM, B.L.; PEERSCHKE, E.I.; WILLIS, A.C.; REID, K.B. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "Heads" of Clq. *J Exp Med.* v. 179, p.1809-1821, 1994.
 76. GHEBREHIWET, B.; PEERSCHKE, E.I. Structure and function of gC1q-R: a multiligand binding cellular protein. *Immunobiology.* v.199(2), p.225-238, 1998.
 77. 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.
 78. GODFROID, J.; SCHOLZ, H.C.; BARBIER, T.; NICOLAS, C.; WATTIAU, P.; FRETIN, D.; WHATMORE, A.M.; CLOECKAERT, A.; BLASCO, J.M.; MORIYON, I.; SAEGERMAN, C.; MUMA, J.B.; AL DAHOUK, S.; NEUBAUER, H.; LETESSON, J.J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med.* v.102(2), p.118-131, 2011.
 79. GOLDING, B.; SCOTT, D.E.; SCHARF, O.; HUANG, L.Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM C.; ELLER N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.*, v.3(1), p.43-48, 2001.
 80. GÖRG, A.; WEISS, W.; GÜNTHER S. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* v.4(12), p.3665-3685, 2004.
 81. GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* v.90(1-4), p.281-297, 2002.
 82. GUPTA, R.S. Protein signatures distinctive of alpha proteobacteria and its subgroups and a model for alpha-proteobacterial evolution. *Crit Rev Microbiol.* v.31(2), p.101-135, 2005.

83. HALLING, S.M.; PETERSON-BURCH, B.D.; BRICKER, B.J.; ZUERNER, R.L.; QING, Z.; LI, L.L.; KAPUR, V.; ALT, D.P.; OLSEN, S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol.* v.187(8), p.2715-2726, 2005.
84. HAUCK, S.M.; SCHOEFFMANN, S.; AMANN, B.; STANGASSINGER, M.; GERHARDS, H.; UEFFING, M.; DEEG, C.A. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res.* v.6(6), p.2121-2131, 2007.
85. HERNÁNDEZ-MORA, G.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; MORALES, J.A.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; BARQUERO-CALVO, E.; DEMIGUEL, M.J.; MARÍN, C.M.; BLASCO, J.M.; MORENO, E. Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica. *Emerg Infect Dis.* v.14(9), p.1430-1433, 2008.
86. HOLDEN, H.M.; RAYMENT, I.; THODEN, J.B. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem.* v.278(45), p.43885-43888, 2003.
87. HOWARD, J. The IRG proteins: a function in search of a mechanism. *Immunol.* v.213, p.367-375, 2008.
88. HUANG, L.Y.; ISHII, K.J.; AKIRA, S.; ALIBERTI, J.; GOLDING, B. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *J Immunol.* v.175(6), p.3964-3970, 2005.
89. HUDDLESON, I.F. The differentiation of the species of the genus *Brucella*, Technical Bull. No. 100, Bacteriological Section, Michigan Agricultural Experiment Station, 1929.
90. HUSEBYE, H.; AUNE, M.H.; STENVIK, J.; SAMSTAD, E.; SKJELDAL, F.; HALAAS, Ø.; NILSEN, N.J.; STENMARK, H.; LATZ, E.; LIEN, E.; MOLLNES, T.E.; BAKKE, O.; ESPEVIK, T. The Rab11a GTPase Controls Toll-like Receptor 4-Induced Activation of Interferon Regulatory Factor-3 on Phagosomes. *Immunity* v.33, p.583-596, 2010
91. IGWEBUIKE, U.M. Trophoblast cells of ruminant placentas--A minireview. *Anim Reprod Sci.* v.93(3-4), p.185-198, 2006.
92. IKEDA, N.; INOBUCHI, T.; SONODA, N.; FUJII, M.; TAKEI, R.; HIRATA, E.; YOKOMIZO, H.; ZHENG, J.; MAEDA, Y.; KOBAYASHI, K.; TAKAYANAGI, R. Biliverdin protects against the deterioration of glucose tolerance in db/db mice. *Diabetology.* v.54(8), p.2183-2191, 2011.
93. Instrução normativa nº 6, de 08 de Janeiro de 2004. Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF]. Diário Oficial da União, Brasília, Df, 12 Jan. 2004. Seção 1, p.6.
94. JANEWAY, C. A. The T cell receptor as multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 10, p. 645-674, 1992.
95. JIANG, X.; LEONARD, B.; BENSON, R.; BALDWIN, C.L.

- Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol.*, v.151, p.309-319, 1993.
96. JIANG, X; BALDWIM, C. L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.61, p.124-134, 1993.
 97. 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.
 98. JORDENS, I., MARSMAN, M., KUIJL, C., NEEFJES, J. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic.* v.6, p.1070-1077, 2005.
 99. KANDUC, D. Translational regulation of human papillomavirus type 16 E7 RNAm by the peptide SEQIKA, shared by rabbit alpha(1)-globin and human cytokeratin 7. *J Pathol.* v.184(3), p.234-239, 1998.
 100. KAZMI, S.; KRULL, I.S. Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. *Pharma Genomics.* p.14-29, 2001.
 101. KISHIMOTO, Y.; HIRAIWA, M.; O'BRIEN, J.S. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J Lipid Res.* v.33(9), p.1255-67, 1992.
 102. KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* v.26(3), p.231-243, 1975.
 103. 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. 6(1), p.65-78, 2003.
 104. KOPP, E.B.; MEDZHITOV, R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, v.11, p.13-18, 1999.
 105. KOSTENKO, S.; MOENS, U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci.* v.66(20), p.3289-32307, 2009.
 106. KUWABARA, I.; KUWABARA, Y.; YANG, R.Y., SCHULER, M.; GREEN, D.R.; ZURAW, B.L.; HSU, D.K.; LIU, F.T. *et al.* Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem.* v.277, p.3487-3497, 2002.
 107. LAGE, A.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LOBO, J.R. O programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal em 2008. *Leite Integral*, v.3, p.40-46, 2008.
 108. LAGE, A.P.; POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.E.; CAVALLÉRO, J.C.M.; FERREIRA-NETO, J.S.; MOTTA, P.M.P.C.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R. Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. *Cad. Tec Vet. Zootec*, n.47, p.99-110, 2005.
 109. LAMBERT, G.; MANTHEI, C.A.; DEYOE, B.L. Studies on *Brucella abortus* infection in bulls. *Am. J. Vet. Res.* v. 24(103), p. 1153-1157, 1963.
 110. LAMONTAGNE, J.; FOREST, A.; MARAZZO, E.; DENIS, F.; BUTLER, H.; MICHAUD, J.F.; BOUCHER, L.; PEDRO, I;

- VILLENEUVE, A.; SITNIKOV, D.; TRUDEL, K.; NASSIF, N.; BOUDJELTI, D.; TOMAKI, F.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; BRUNET, S.; CÔTÉ-MARTIN, A.; HUNTER, J.; MORENO, E.; PARAMITHIOTIS, E. Intracellular Adaptation of *Brucella abortus*. *J Proteome Res.*, v.8, p.1594-1609, 2009.
111. LANGBEIN, L.; ROGERS, MA.; WINTER, H.; PRAETZEL, S.; BECKHAUS, U.; RACKWITZ, H.R.; SCHWEIZER, J. The catalog of human hair keratins I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem.* v.19, p.874-84, 1999.
112. LANNEAU, D.; BRUNET, M.; FRISAN, E.; SOLARY, E.; FONTENAY, M.; GARRIDO, C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.* 2008; v.12, p.743-761, 2008.
113. LAPAQUE, N.; MULLER, A.; ALEXOPOULOU, L.; HOWARD, J.C.; GORVEL, J.P. *Brucella abortus* induces Irgm3 and Irga6 expression via type-I IFN by a MyD88-dependent pathway, without the requirement of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9. *Microb Pathog.* v.47, p.299-304, 2009.
114. LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; AL DAHOUK, S.; BOUCHON, P.; DENOEUDE, F.; NOCKLER, K.; NEUBAUER, H.; GUILLOTEAU, L.A.; VERGNAUD, G. Evolution and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiology*, v. 6, n. 9, 2006.
115. LEAL-KLEVEZAS, D.S.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J.P. Molecular detection of *Brucella* spp: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Arch. Med. Res.*, v.26, p.263-267, 1995.
116. LIN, J.; FICHT, T.A. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun.* v.63, p.1409-1414, 1995.
117. LIU, L.; GUO, Z.; TIEU, Q.; CASTLE, A.; CASTLE, D. Role of Secretory Carrier Membrane Protein SCAMP2 in Granule Exocytosis. *Molecular Biology of the Cell.* v.13, p.4266-4278, 2002.
118. LIU, L.; LIAO, H.; CASTLE, A.; ZHANG, J.; CASANOVA, J.; SZABO, G.; CASTLE, D. SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell.* v.16, p.4463-4472, 2005.
119. LO, A.S.; LIEW, C.T.; NGAI, S.M.; TSUI, S.K.; FUNG, K.P.; LEE, C.Y.; WAYE M.M. Developmental regulation and cellular distribution of human cytosolic malate dehydrogenase (MDH1). *J Mol Biol.* v.372(4), p.1022-1033, 2007.
120. LÓPEZ-GOÑI, I.; YOLDI-GARCIA, D.; MARÍN, C.M.; MIGUEL M.J.; MUNÓZ, P.M.; BLASCO, J.M.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; FERREIRA, A.C.; CARDOSO, R.; CORRÊA DE SÁ, M.I.; WALRAVENS, K.; ALBERT, D.; GARIN-BASTUJI, B. Evaluation of a Multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccina strains. *J Clin Microbiol*, v.26(10), p.3484-3487, 2008.

121. MACEDO, G.C.; MAGNANI, D.M.; CARVALHO, N.B.; BRUNAROMERO, O.; GAZZINELLI, R.T.; OLIVEIRA, S.C. 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.
122. MAGINI, A.; MENCARELLI, S.; TANCINI, B.; CICCARONE, V.; URBANELLI, L.; HASILIK, A.; EMILIANI, C. Identification and characterization of mature beta-hexosaminidases associated with human placenta lysosomal membrane. *Biosci Rep.* v.28(4), p.229-37, 2008.
123. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/DAS, 2006. 184p.
124. MCCAUGHEY, W.J.; PURCELL, D.A. Brucellosis in bull. *Vet. Rec.*, v.93, p.336-37, 1973.
125. MCDONALD, W.L.; JAMALUDIN, R.; MACKERETH, G.; HANSEN, M.; HUMPHREY, S.; SHORT, P.; TAYLOR, T.; SWINGLER, J.; DAWSON, C.E.; WHATMORE, A.M.; STUBBERFIELD, E.; PERRETT, L.L.; SIMMONS, G. 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(12), p.4363-4370, 2006.
126. MCQUISTON, J.R.; VEMULAPALLI, R.; INZANA, T.J.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; FRITZINGER, D.; HADFIELD, T.L.; WARREN, R.A.; LINDLER, L.E.; SNELLINGS, N.; HOOVER, D.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect Immun.* v.67(8), p.3830-3935, 1999.
127. MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Veterinary Pathology.* v.26(5), p.357-368, 1989.
128. MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY JR., C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v.388, p.394-397, 1997.
129. MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. *J. Hyg. Comp.* v.38, p.732-742, 1938.
130. MILLER, I.; RADWAN, M.; STROBL, B.; MÜLLER, M.; GEMEINER, M.; Contribution of cell culture additives to the two-dimensional protein patterns of mouse macrophages. *Electrophoresis.* v.27(8), p.1626-1629, 2006.
131. MITCHELL, G.A.; LOONEY, J.E.; BRODY, L.C.; STEEL, G.; SUCHANEK, M.; ENGELHARDT, J.F.; WILLARD, H.F.; VALLE, D. Ornithine-delta-aminotransferase cDNA cloning and analysis of the structural gene. *Journal of biological chemistry.* v.28(5), p.14288-14295, 1988.
132. MORRIS, J.A. The use of polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of *Brucella*. *J Gen Microbiol.* v.76, p.231-237, 1973.

133. MOSSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 7, p.145-173, 1989.
134. NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v.9, p.255-262, 1988.
135. NICOLETTI, P. Bovine abortion caused by *Brucella* sp. In: Kirkbride, C.A. (Ed.). *Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion*. 3. Ed. Ames: Iowa State University Press, 1990. p.22-26.
136. NIELSEN, K.; HECK, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella* by primary and secondary binding assays. *Prev. Vet. Med.*, v.2, p.197-204, 1984.
137. NIELSEN, K.H.; EWALT, D.R. Bovine Brucellosis. In: Office International des Epizooties. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 5 ed. Paris: Office international des Epizooties, p.328-345, 2004.
138. OCAMPO-SOSA, A.A.; BALBÍN, J.A.; GARCIA-LOBOI, J.M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 the new subgroup 3b of biovar 3. *Veterinary Microbiology*, v.110, p.41-51, 2005.
139. O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. v.250(10), p. 4007-4021, 1975.
140. OLIVEIRA, S.C.; DE OLIVEIRA, F.S.; MACEDO, G.C.; DE ALMEIDA, L.A.; CARVALHO, N.B. 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.
141. OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. A. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.417-24, 2002.
142. OLIVEIRA, S. C.; HARMS, J. S.; RECH, E. L.; RODARTE, R. S.; BOCCA, A. L.; GOES, A. .M.; SPLITTER, G. A. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.31, p.77-84, 1998.
143. OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G. A. CD8+ type 1 CD44hi CD45Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, v.25, p.2551-2557, 1995.
144. ONG, S.E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*, v.1, p.252-262, 2005.
145. PAI, T.; CHEN, Q.; ZHANG, Y.; ZOLFAGHARI, R.; ROSS, A.C. Galactomutarotase and other galactose-related genes are rapidly induced by retinoic acid in human myeloid cells. *Biochemistry*. v.46(51), p.15198-207, 2007.
146. PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. v.30, Suppl 1, p.29-31, 2007.

147. PARK, J.S.; GAMBONI-ROBERTSON, F.; HE, Q.; SVETKAUSKAITE, D.; KIM, J.Y.; STRASSHEIM, D.; SOHN, J.W.; YAMADA, S.; MARUYAMA, I.; BANERJEE, A.; ISHIZAKA, A.; ABRAHAM, E. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors, *Am J Physiol Cell Physiol*. v.290(3), p.C917-924, 2006.
148. PAULSEN, I.T.; SESHADRI, R.; NELSON, K.E.; EISEN, J.A.; HEIDELBERG, J.F.; READ, T.D.; DODSON, R.J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L.M.; BEANAN, M.J.; DAUGHERTY, S.C.; DEBOY, R.T.; DURKIN, A.S.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; NELSON, W.C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S.E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S.R.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; HOOVER, D.L.; LINDLER, L.E.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M.; FRASER, C.M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.99(20), p.13148-13153, 2002.
149. PAYNE, J.M.; The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *Journal of Pathology and Bacteriology*. v.78, p.447-463, 1959.
150. PETERSON, K.L.; ZHANG, W.; LU, P.D.; KEILBAUGH, S.A.; PEERSCHKE, E.I.; GHEBREHIWET, B. The C1q-binding cell membrane proteins cC1q-R and gC1q-R are released from activated cells: subcellular distribution and immunochemical characterization. *Clin Immunol Immunopathol*. v.84(1), p.17-26, 1997.
151. PIKE, M.C.; DEMEESTER, C.A. Inhibition of phosphoinositide metabolism in human polymorphonuclear leukocytes by S-adenosylhomocysteine. *J Biol Chem*, v.263, p.3592-3599, 1988.
152. PISETSKY, D.S.; JIANG, W. Role of Toll-like receptors in HMGB1 release from macrophages. *Ann N Y Acad Sci*. v.1109, p.58-65, 2007.
153. PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect*. v.2(7), p.829-835, 2000.
154. PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; MEGE, J.L.; GORVEL, J.P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun*. v.66, p.2387-2392, 1998.
155. POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L.; OLSEN, S.C.; SCHURING, G.G.; LAGE, A.P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, p.5327-5334, 2006.
156. POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; LAGE, A.P. Diagnóstico da brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec*. n.47, p.13-29, 2005.
157. POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbio.*, v.90, p.55-62, 2002.
158. PORTE, F.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S. Early acidificação of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun*. v.67, p.4041-4047, 1999.

159. PRYDE, K.R.; HIRST, J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I. *J Biol Chem.* v.286(20), p.18056-18065, 2011.
160. RABINOVICH, G.A.; GRUPPI, A. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease *Parasite Immunology.* v.27, p.103-114, 2005.
161. RADHAKRISHNAN, G.K.; YU, Q.; HARMS, J.S.; SPLITTER, G.A. *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *J Biol Chem.* v.284, p.9892-9898, 2009.
162. RAFIE-KOLPIN, M.; ESSENBERG, R.C.; WYCKOFF, J.H.3rd. Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various estresse conditions in *Brucella abortus*. *Infect Immun.* v.64, p.5274-5283, 1996.
163. RANKIN, J.E.F. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. *Vet. Rec.*, v.77, p.132-35, 1965.
164. RICHMOND, J. Y.; MCKINNEY, R. W. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 3 ed. Washington: Nacional Institutes of Health/Centers for disease control and prevention. p.85-86, 1993.
165. RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A. HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z.M.M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol.* v.87, p.139-147, 2002.
166. RITTING, M.G.; KAUFMANN, A.; ROBINS, A.; SHAW, B.; SPRENGER, H.; GEMSA, D.; FOULONGNE, V.; ROUOT, B.; DORNAND, J. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J. Leuk. Biol.* v.74, p.1045-1055, 2003.
167. ROCK, F.L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J.C.; KASTELEIN, R.A.; BAZAN, J.F.A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.588-593, 1998.
168. ROOP, R.M.2nd.; GAINES, J.M.; ANDERSON, E.S.; CASWELL, C.C.; MARTIN, D.W. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol.* v.198(4), p.221-238, 2009.
169. ROSENSTIEL, P.; SCHREIBER, S. NOD-like receptors--pivotal guardians of the immunological integrity of barrier organs. *Adv Exp Med Biol.* v.653, p.35-47, 2009.
170. ROSET, M.S.; CIOCCHINI, A.E.; UGALDE, R.A.; IÑÓN DE IANNINO, N. The *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J Bacteriol.* v.188(14), p.5003-5013, 2006.
171. ROSS, H.M.; FOSTER, G.; REID, R.J.; JAHANS, K.; MACMILLAN, A.P. *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec.* v.134(14), p.359, 1994.
172. SALCEDO, S.P.; MARCHESINI, M.; LELOUARD, H.; FUGIER, E.; JOLLY, G.; BALOR, S.; MULLER, A.; LAPAQUE, N.; DEMARIA, O.; ALEXOPOULOU, L.; COMERCI, D.; UGALDE, R.A.; PIERRE, P.;

- GORVEL, J.P. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-Containing Protein Btp1. *PLoS Pathog.* v.4(2), p.e21, 2008.
173. SALMERON, I.; RODRIGUEZAPATA, M.; SALMERON, O.; MANZANO, L.; VAQUER, S.; ALVAREZ-MON, M. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 15, p.764-770, 1992.
174. SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* v.19, p.55-63, 1996.
175. SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases.* v.16, p.95-101, 1993.
176. SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.53(3), p.359-363, 1992.
177. SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 1º Ed. Belo Horizonte: FEP – MVZ, 1998. 221p.
178. SANTOS, J.M.; VERSTREATE, D.R.; PERERA, V.Y.; WINTER, A.J. Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infect Immun.* v.46, p.188-194, 1984.
179. SANTOS, R.L.; PEIXOTO, M.T.D.; SERAKIDES, R.; COSTA, G.M.; MARTINS, N. E. Detección de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa en el testículo y en el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch.Reprod. Anim.* p.34-41, 1998.
180. SASO, Y.; CONNER, E.M.; TEEGARDEN, B.R.; YUAN, C.S. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor mediates immunosuppressive effects in vivo: suppression of delayed type hypersensitivity ear swelling and peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* v.296(1),p.106-12, 2001.
181. SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E.; WHATMORE, A.M.; QUANCE, C.R.; KOYLASS, M.S.; CUMMINS, B.L.; DICK JR, E.J.; SNIDER, C.L.; CAPPELLI, D.; EBERSOLE, J.L.; NATHANIELSZ, P.W.; HUBBARD, G.B. 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, 2008.
182. SCHMID, T.C.; URLAUB, H. iTRAQ-labeling of in-gel digested proteins for relative quantification. *Methods Mol Biol.* v.564, p.207-226, 2009.
183. SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* v.60(Pt 4), p.801-8, 2010.
184. SCHOLZ, H.C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE A.M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRÜGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from

- mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* v.9(2), p.153-156, 2009.
185. SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; A.L.; DAHOU, K S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* v.58(Pt 2), p.375-382, 2008a.
 186. SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; NESVADBOVA, J.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; LE FLÈCHE, P.; WHATMORE, A.M.; AL DAHOUK, S.; KRÜGER, M.; LODRI, C.; PFEFFER, M. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis.* v.14(8), p.1316-1317, 2008b.
 187. SCHOLZ, H.C.; PFEFFER, M.; WITTE, A.; NEUBAUER, H.; AL DAHOUK, S.; WERNERY, U.; TOMASO, H. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the *recA* gene. *J Med Microbiol.* v.57(Pt 1):64-71, 2008c.
 188. SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M II.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.* v.28, p.171-188, 1991.
 189. SELEEM, M. N.; STEPHEN, B.M.; SRIRANGANATHAN, N. *Brucella*: A pathogen without classic virulence genes, *Vet Microbiol.* v.129, p.1-14, 2007.
 190. SENGUPTA, AD.; KOBLANSKY, A.; GAINES, J.; BROWN, T.; WEST, A.P.; ZHANG D.; NISHIKAWA, T.; PARK, S.G.; ROOP, R.M.2nd, GHOSH, S. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J Immunol.* v.84, p.956-964, 2010.
 191. SILVA, V.G.S.O.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, COSTA, M.E.L.S; LOBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, supl. 1, p.109-117, 2009.
 192. SIMMONS, G.C.; HALT, W.T.K. *Aust. Vet. J.* v.29, p.33, 1953.
 193. SLOANE, J.A.; BLITZ, D.; MARGOLIN, Z.; VARTANIAN, T. A clear and present danger: endogenous ligands of Toll-like receptors. *Neuromolecular Med.* v.12(2), p.149-63, 2010.
 194. SOHN, A.H.; PROBERT, W.S.; GLASER, C.A.; GUPTA, N.; BOLLEN, A.W.; WONG, J.D.; GRACE, E.M.; MCDONALD, W.C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis.* v.9(4), p.485-488, 2003.
 195. STEVENS, M. G.; PUGH Jr., G. W.; TABATABAI, L. B. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect. Immun.*, v.60, p. 4407-4409, 1992.
 196. STOENNER, H.G.; LACKMAN, D.B. A new species of *Brucella* isolated from the wood rat, *Neotomae*

- lepida. Amer. J. Vet. Res.* v.18, p.947-951, 1957.
197. STOLF, B.S.; IOANNIS, S.; LOPES, L.R.; VENDRAMIN, A.; GOTO, H.; LAURINDO, F.R.; SHAH, A.M.; SANTOS, C.X. Protein Disulfide Isomerase and Host-Pathogen Interaction *The Scientific World Journal.* v.11, p.1749–1761, 2011.
 198. STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. 180p.
 199. TABATABAI, L.B.; DEYOE, B.L. Characterization of salt-extractable protein antigens from *Brucella abortus* by crossed immunoelectrophoresis and isoelectric focusing. *Vet Microbiol.* v.9(6), p.549-560, 1984.
 200. TANNU, N.S.; HEMBY, S.E. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc.* v.1(4), p.1732-42, 2006.
 201. TAYLOR, G.A. IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* v.9, p.1099-1107, 2007.
 202. TEIXEIRA, P.; VALLE, S. Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Fiocruz-RJ. 362p., 1996.
 203. TEIXEIRA-GOMES, A.P.; CLOECKAERT, A.; BÉZARD, G.; DUBRAY, G.; ZYGMUNT, M.S. Mapping and identification of *Brucella melitensis* proteins by two-dimensional electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis.* v.18, p.156-162, 1997.
 204. THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella.* In: Gyles CL, Thoen CO. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals.* 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p.236-247.
 205. TILLER, R.V.; GEE, J.E.; FRACE, M.A.; TAYLOR, T.K.; SETUBAL, J.C.; HOFFMASTER, A.R.; DE, B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl Environ Microbiol.* v.76(17), p.5837-5845, 2010.
 206. TIMSON, D.J.; REECE, R.J. Identification and characterisation of human aldose 1-epimerase. *FEBS Letters.* v. 543, p.21-24, 2003.
 207. TOYOOKA, K.; MATSUOKA, K. Exo- and endocytotic trafficking of SCAMP2. *Biol. Chem.* 277, 32063–32070. *Plant Signal Behav.* v.4(12), p.1196-1198, 2009.
 208. TSOLIS, R.M.; SESHADRI, R.; SANTOS, R.L.; SANGARI, F.J.; LOBO, J.M.; DE JONG, M.F.; REN, Q.; MYERS, G.; BRINKAC, L.M.; NELSON, W.C.; DEBOY, R.T.; ANGIUOLI, S.; KHOURI, H.; DIMITROV, G.; ROBINSON, J.R.; MULLIGAN, S.; WALKER, R.L.; ELZER, P.E.; HASSAN, K.A.; PAULSEN, I.T. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One.* v.4(5), p.e5519, 2009.
 209. TRICHARD, C.J.; HERR, S.; BASTIANELLO, S.S.; ROUX, D. Unilateral orchitis in a bull caused by *Brucella abortus* biotype 1. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* v.53(1), p.60-62, 1982.
 210. TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. *Nature.* v.422, p.193-197, 2003.

211. UELAND, P.M.; HELLAND, S.; BROCH, O.J.; SCHANCHE, J.S. Homocysteine in tissues of the mouse and rat. *J Biol Chem.* v.259, p.2360-2364, 1984.
212. UZUREAU, S.; LEMAIRE, J.; DELAIVE, E.; DIEU, M.; GAIGNEAUX, A.; RAES, M.; DE BOLLE, X.; LETESSON, J.J. Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res.* v.9, p.3200-3217, 2010.
213. VENTURA, G.; DE BANDT, J.P.; SEGAUD, F.; PERRET, C.; ROBIC, D.; LEVILLAIN, O.; LE PLENIER, S.; GODARD, C.; CYNOBER, L.; MOINARD, C. Overexpression of ornithine aminotransferase: consequences on amino acid homeostasis *British Journal of Nutrition* v.101, p.843–851, 2009.
214. VENTURA, G.; MOINARD, C.; SEGAUD, F.; LE PLENIER, S.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.P. Adaptative response of nitrogen metabolism in early endotoxemia: role of ornithine aminotransferase. *Amino Acids.* v.39, p.1417–1426, 2010.
215. VERSTREATE, D.R.; CREAMY, M.T.; CAVENEY, N.T.; BALDWIN, C.L.; BLAB, M.W.; WINTER, A.J. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect Immun.* v.35, p.979-989, 1982.
216. VERSTREATE, D.R.; WINTER, A.J. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun.* v.46, p.182-187, 1984.
217. VILLENEUVE, C.; BARICAULT, L.; CANELLE, L.; BARBOULE, N.; RACCA, C.; MONSARRAT, B.; MAGNALDO, T.; LARMINAT, F. Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells. *Mol Biol Cell.* v.22(7), p.999-1013, 2011.
218. VIZCAÍNO N, CLOECKAERT A, VERGER J, GRAYON M, FERNÁNDEZ-LAGO L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.* v.2(9), p.1089-1100, 2000.
219. VLAHOVICH, N.; SCHEVZOV, G.; NAIR-SHALIKER, V.; ILKOVSKI, B.; ARTAP, ST.; JOYA, J.E.; KEE, A.J.; NORTH, K.N.; GUNNING, P.W.; HARDEMAN EC. Tropomyosin 4 defines novel filaments in skeletal muscle associated with muscle remodelling/regeneration in normal and diseased muscle. *Gen Physiol Biophys.* v.17(3), p.193-210 1998.
220. VOGEL, H.J. The Merck Frost Award Lecture 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem Cell Biol.* v.72(9-10), p.357-376, 1994.
221. WAGNER, M.A.; ESCHENBRENNER, M.; HORN, T.A.; KRAYCER, J.A.; MUJER, C.V.; HAGIUS S, ELZER, P.; DELVECCHIO, V.G. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: Identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics.* v.2, p.1047-1060, 2002.

222. WANG, M.; QURESHI, N.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. *Microb. Pathol.* v.31(5), p.221-230, 2001.
223. WANG, Y.; CHEN, Z.; QIAO, F.; YING, T.; YUAN, J.; ZHONG, Z.; ZHOU, L.; DU, X.; WANG, Z.; ZHAO, J.; DONG, S.; JIA, L.; YUAN, X.; YANG, R.; SUN, Y.; HUANG, L. Comparative Proteomics Analyses Reveal the *virB* of *B. melitensis* Affects Expression of Intracellular Survival Related Proteins. *PLoS ONE*, v.4, p.1-15, 2009.
224. WEARSCH, P.A.; CRESSWELL, P. Selective loading of highaffinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat. Immunol.*, v.8, 873-881, 2007.
225. WEISS, D. S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A.; MORENO, E. MyD88, but Not Toll-Like Receptors 4 and 2, Is Required for Efficient Clearance of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, v. 73(8), p.5137-5143, 2005.
226. WHATMORE, A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, v.9(9), p.1168-1184, 2009.
227. WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.C.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nature Biotechnology*. v.14 (1), p.61-65, 1996.
228. WILLIAMS, K.P.; SOBRAL, B.W.; DICKERMAN, A.W. A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J Bacteriol.* v.189(13), p.4578-4586, 2007.
229. WOOD, Z.A.; SCHRODER, E.; ROBIN HARRIS, J.; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* v.28, p.32-40, 2003.
230. WU, W.W.; WANG, G.; BAEK, S J.; SHEN, R.F. Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF *Journal of Proteome Research*. v.5(3), p.651-658, 2006.
231. WU, Q.L.; FU, Y.F.; ZHOU, W.L.; FENG, Y.H.; LIU, J.; XU, J.Y.; HE, P.L.; ZHOU, R.; TANG, W.; WANG, G.F.; ZHOU, Y.; YANG, Y.F.; DING, J.; LI, X.Y.; CHEN, X.R.; YUAN, C.; LAWSON, B.R.; ZUO, J.P. Inhibition of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase induces immunosuppression. *J Pharmacol Exp Ther.* v.313, p.705-711, 2005.
209. WYATT, H. V. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *J R Soc Med.* v.98(10), p. 451-454, 2005.
210. WYCKOFF III, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 395-415, 2002.
211. XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P.;

- SANTOS, R.L. 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.
212. YADAV, U.C.; RAMANA, K.V.; AGUILERA-AGUIRRE, L.; BOLDOGH, I.; BOULARES, H.A.; SRIVASTAVA, S.K. Inhibition of aldose reductase prevents experimental allergic airway inflammation in mice. *PLoS One.* v.4(8), p.e6535, 2009.
213. YANG, H.; TRACEY, K.J High mobility group box 1 (HMGB1). *Crit Care Med.* v.33(12 Suppl), p.S472-474, 2005.
214. YANG, Y.; YIN, J.; GUO, D.; LANG, X.; WANG, X. Immunization of mice with recombinant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase protein confers protection against *Brucella melitensis* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* v.61(2), p.159-167, 2011.
215. YAO, Y.; SQUIER, T.C. Variable conformation and dynamics of calmodulin complexed with peptides derived from the autoinhibitory domains of target proteins. *Biochemistry.* v.35(21), p.6815-6827, 1996
216. YI, E.C.; GOODLETT, D.R. Quantitative protein profile comparisons using the isotope-coded affinity tag method. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 23:Unit 23.2, 2004.
217. YUAN, C.S.; SASO, Y.; LAZARIDES, E.; BORCHARDT, R.T.; ROBINS, M.J. Recent advances in S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors and their potential clinical applications. *Exp Opin Ther Patents,* v.9, p.1197–1206, 1999.
218. ZAMMIT, T. A preliminary note on the susceptibility of goats to Malta Fever. *Proc R Soc* 1905; 76B: 377-8. [Also *J R Army Med Corps* v.5, p.341-342, 1905.

Anexo 1 - Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do protocolo experimental usado (CETEA – Protocolo 183/2010).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 183/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Análise diferencial por gel 2D dos perfis de expressão protéica de células trofoblásticas e de macrófagos infectados by Brucella Abortus 2308**", que tem como responsável(is) **Andrey Pereira Lage**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **17/ 11/2010**.


Este certificado expira-se em **17/ 11/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 183/2010**, related to the project entitled "**Differential analysis by 2D of protein expression profiles of bovine trophoblast cells and macrophages infected by Brucella Abortus 2308**", under the supervisors of **Andrey Pereira Lage**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 17, 2010**.

This certificate expires in **November 17, 2015**.

Belo Horizonte, 19 de Novembro de 2010.


Prof.ª Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@orgq.ufmg.br

(Mod Cert v1.0)

Anexo 2 – Identificação das proteínas diferencialmente expressas em células trofoblásticas não infectadas e infectadas nos tempos de 0,5 hora e 4 horas pós-infecção. Número do *spot* se refere à identificação do *spot* nas Figuras 14 e 15.

Número <i>Spot</i>	Identificação Proteína	GI	Sequência	Escore	% Cobertura
1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735541	192 – 210 R.EDEEESLNEVGYYDDIGGCR.K + Carbamidomethyl (C) 466 – 487 R.ETVVEVPQVTWEDIGGLEDVKR.E 616 – 638 K.NVFIIGATNRPDIIDPAILRPGR.L	237	10
2	Transitional endoplasmic reticulum ATPase [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735541	192 – 210 R.EDEEESLNEVGYYDDIGGCR.K + Carbamidomethyl (C) 466 – 487 R.ETVVEVPQVTWEDIGGLEDVKR.E 616 – 638 K.NVFIIGATNRPDIIDPAILRPGR.L	237	10
3	Gelsolin isoform b [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736201	347 – 368 R.DPDQTDGPGLSYLSSHIANVER.V 369 – 393 R.VPFDAATLHTSTAMAAQHGMDDDDGR.G 407 – 430 K.VPVDPATYGFYGGDSYIILYNYR.H 576 – 597 R.AQPVQVAEGSEPDSFWEALGGK.A	365	12
4	Não identificado				
5	Gelsolin isoform b [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736201	347 – 368 R.DPDQTDGPGLSYLSSHIANVER.V 369 – 393 R.VPFDAATLHTSTAMAAQHGMDDDDGR.G 407 – 430 K.VPVDPATYGFYGGDSYIILYNYR.H 576 – 597 R.AQPVQVAEGSEPDSFWEALGGK.A	365	12
6	Alpha-fetoprotein precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735479	82 – 100 K.QPAGCLENQVSAFLEEICR.E 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 305 – 333 K.LPTTLELGHCIHAENDDKPEGLSPNVNR.F Carbamidomethyl (C) 470 – 488 K.QLACGEGVADLIIGHLCIR.H 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 489 – 509 R.HEENPINPGVDQCCTSSYSNR.R 2 Carbamidomethyl (C) 510 – 531 R.RPCFSSLVVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C) 510 – 536 R.RPCFSSLVVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C)	503	18
7	Alpha-fetoprotein precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735479	82 – 100 K.QPAGCLENQVSAFLEEICR.E 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 305 – 333 K.LPTTLELGHCIHAENDDKPEGLSPNVNR.F Carbamidomethyl (C) 470 – 488 K.QLACGEGVADLIIGHLCIR.H 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 489 – 509 R.HEENPINPGVDQCCTSSYSNR.R 2 Carbamidomethyl (C) 510 – 531 R.RPCFSSLVVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C) 510 – 536 R.RPCFSSLVVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C)	503	18
8	ALB protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 154425704	52 – 65 F.SQYLQCCPFDEHVK.L Carbamidomethyl (C) 89 – 100 K.SLHTLFGDELCK.V Carbamidomethyl (C)	1041	22

			267 – 280 K.ECCHGDLLECADDR.A 3 Carbamidomethyl (C) 347 – 359 K.DAFLGSFLYEYSR.R 360 – 371 R.RHPEYAVSVLLR.L 421 – 433 K.LGEYGFQNELIVR.Y 437 – 451 R.KVPQVSTPTLVEVSR.S 469 – 482 R.MPCAEDYLSLILNR.L Carbamidomethyl (C) 508 – 523 R.RPCFSALTPDETYVPK.A Carbamidomethyl (C) 529 – 544 K.LFTFHADICTLPDTEK.Q Carbamidomethyl (C)		
9	ALB protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 154425704	52 – 65 F.SQYLQQCPFDEHVK.L Carbamidomethyl (C) 89 – 100 K.SLHTLFGDELCK.V Carbamidomethyl (C) 267 – 280 K.ECCHGDLLECADDR.A 3 Carbamidomethyl (C) 347 – 359 K.DAFLGSFLYEYSR.R 360 – 371 R.RHPEYAVSVLLR.L 421 – 433 K.LGEYGFQNELIVR.Y 437 – 451 R.KVPQVSTPTLVEVSR.S 469 – 482 R.MPCAEDYLSLILNR.L Carbamidomethyl (C) 508 – 523 R.RPCFSALTPDETYVPK.A Carbamidomethyl (C) 529 – 544 K.LFTFHADICTLPDTEK.Q Carbamidomethyl (C)	1041	22
10	ALB protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 154425704	52 – 65 F.SQYLQQCPFDEHVK.L Carbamidomethyl (C) 89 – 100 K.SLHTLFGDELCK.V Carbamidomethyl (C) 267 – 280 K.ECCHGDLLECADDR.A 3 Carbamidomethyl (C) 347 – 359 K.DAFLGSFLYEYSR.R 360 – 371 R.RHPEYAVSVLLR.L 421 – 433 K.LGEYGFQNELIVR.Y 437 – 451 R.KVPQVSTPTLVEVSR.S 469 – 482 R.MPCAEDYLSLILNR.L Carbamidomethyl (C) 508 – 523 R.RPCFSALTPDETYVPK.A Carbamidomethyl (C) 529 – 544 K.LFTFHADICTLPDTEK.Q Carbamidomethyl (C)	1041	22
11	ALB protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 154425704	52 – 65 F.SQYLQQCPFDEHVK.L Carbamidomethyl (C) 89 – 100 K.SLHTLFGDELCK.V Carbamidomethyl (C) 267 – 280 K.ECCHGDLLECADDR.A 3 Carbamidomethyl (C) 347 – 359 K.DAFLGSFLYEYSR.R 360 – 371 R.RHPEYAVSVLLR.L 421 – 433 K.LGEYGFQNELIVR.Y 437 – 451 R.KVPQVSTPTLVEVSR.S 469 – 482 R.MPCAEDYLSLILNR.L Carbamidomethyl (C) 508 – 523 R.RPCFSALTPDETYVPK.A Carbamidomethyl (C) 529 – 544 K.LFTFHADICTLPDTEK.Q Carbamidomethyl (C)	1041	22
12	Alpha-fetoprotein precursor [<i>Bos</i>	gi 77735479	162 – 168 R.YIYEIAR.R	252	5

	<i>taurus</i>]		272 – 283 K.GNVLECLQDGER.V Carbamidomethyl (C) 355 – 361 R.FTYEYSR.R 551 – 559 K.QQFLINLVK.Q		
13	Inositol-3-phosphate synthase 1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 114051253	176 – 191 R.PSVYIPEFIAANQSAR.A 234 – 250 R.FCEVIPGLNDAENLLR.T + Carbamidomethyl (C) 466 – 481 K.APLAPPGSPVVNALFR.Q	347	8
14	Cytokeratin 8 (370 AA) [<i>Bos taurus</i>]	gi 481	133 – 151 R.EMQSQISDTSVVLSMDNNR.N 314 – 342 K.TTSGYAGGLTSSYGTPGFNYSLSPGSFSR.T	388	12
15	Cytokeratin 8 (370 AA) [<i>Bos taurus</i>]	gi 481	133 – 151 R.EMQSQISDTSVVLSMDNNR.N	388	12
16	Cytokeratin 8 (370 AA) [<i>Bos taurus</i>]	gi 481	133 – 151 R.EMQSQISDTSVVLSMDNNR.N 314 – 342 K.TTSGYAGGLTSSYGTPGFNYSLSPGSFSR.T	388	12
17	Cytokeratin 8 (370 AA) [<i>Bos taurus</i>]	gi 481	133 – 151 R.EMQSQISDTSVVLSMDNNR.N 314 – 342 K.TTSGYAGGLTSSYGTPGFNYSLSPGSFSR.T	388	12
18	Creatine kinase B-type [<i>Bos taurus</i>]	gi 62751863	157 – 172 K.LAVEALSSLDGDLAGR.Y 224 – 236 K.TFLVWINEEDHLR.V 321 – 341 R.GTGGVDATAAVGGVFDVSNADR.L	382	13
	Cathepsin D [<i>Bos taurus</i>]	gi 262073106	48 – 57 K.LLDIACWTHR.K Carbamidomethyl (C) 129 – 139 K.FDGILGMAYPR.I 161 – 169 K.NVFSFFLNR.D 327 – 333 R.YYTVFDR.D	156	9
	Beta actin [<i>Bos taurus</i>]	gi 194676388	86 – 96 K.IWHHTFYNELR.V 240 – 255 R.SYELPDGQVITIGNER.F	248	11
19	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5 [<i>Bos taurus</i>]	gi 147899296	48 – 64 K.GDTADEIGQVLHFENVK.D 65 – 79 K.DVPFGFQTVTSDVVK.L	187	12
	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736277	17 – 30 R.ADATNVNNWHWTER.D 213 – 224 R.ESFLTSPEELYR.V	80	7
20	Prostaglandin reductase 2 [<i>Bos taurus</i>]	gi 115497482	25 – 42 R.VEEVNLPCVNEGQVQVR.T Carbamidomethyl (C)	128	5
21	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736025	145 – 167 K.AIAGVINQPYYNYQAGPDAVLGR.T	169	7
22	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736025	145 – 167 K.AIAGVINQPYYNYQAGPDAVLGR.T	169	7
23	Não identificado				
24	Não identificado				
25	F-actin-capping protein subunit beta [<i>Bos taurus</i>]	gi 28603770	95 – 108 R.KLEVEANNAFDQYR.D	50	4
26	3-hydroxyisobutyrate	gi 114052937	61 – 76 K.HGYPLIYDVFPDA <u>C</u> K.E + Carbamidomethyl (C)	388	14

	dehydrogenase, mitochondrial precursor [<i>Bos taurus</i>]		150 – 167 K.MGAVFMDAPVSGGVGAAR.S 298 – 311 K.SPILLGSQAHQIYR.M		
27	Não identificado				
28	Não identificado				
29	Transgelin-2 [<i>Bos taurus</i>]	gi 61888874	21 – 39 K.QYDADLEQILIQWITTQCR.K + Carbamidomethyl (C) 103 – 120 R.YGINTTDIFQTVDLWEGK.N	224	18
	Hemoglobin subunit beta [<i>Bos taurus</i>]	gi 62460494	30 – 39 R.LLVVYPWTQR.F 104 – 115 R.LLGNVLVVVLAR.R	103	15
30	Transthyretin precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 27806789	101 – 123 K.SLGISPHEFAEVVFTANDSGPR.H	107	15
31	Dynein light chain roadblock-type 1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735831	16 – 31 K.GVQGHVVNTEGIPIK.S 59 – 70 R.EIDPQNDLTFLR.I + Glu->pyro-Glu (N-term E)	171	29
40	Não identificado				
41	Não identificado				
42	Não identificado				
43	LDLR chaperone MESD [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735889	84 – 104 K.RPSAPIDFSQIDPGKPESILK.M 126 – 147 K.ETEETISLWQGSLFNANYDVQR.F	199	18
44	Não identificado				
45	Similar to Bola-like protein 2 isoform 1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 76653515	55 – 73 R.LVNTCLAEELLHIHAFEQK.T Carbamidomethyl (C)	115	22
46	Não identificado				
47	Não identificado				
51	Alpha-actinin-4 [<i>Bos taurus</i>]	gi 148238040	167 – 175 K.EGLLLWCQR.K + Carbamidomethyl (C) 301 – 310 R.LASDLLEWIR.R 734 – 745 R.VGWEQLLTIIAR.T 761 – 771 K.GISQEQMQEFR.A	189	5
	Endoplasmic precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 27807263	76 – 84 K.FAFQAEVNR.M 385 – 395 K.SILFVPTSAPR.G 396 – 404 R.GLFDEYGSK.K	145	3
52	Não identificado				
53	Alpha-fetoprotein precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735479	82 – 100 K.QPAGCLENQVSFAFLEEICR.E 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 305 – 333 K.LPTTLELGHCHHAENDDKPEGLSPNVNR.F Carbamidomethyl (C) 470 – 488 K.QLACGEGVADLIIGHLCIR.H 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 489 – 509 R.HEENPINPGVDQCCTSSYSNR.R 2 Carbamidomethyl (C) 510 – 531 R.RPCFSSLVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C) 510 – 536 R.RPCFSSLVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C)	503	18
	Gelsolin isoform a [<i>Bos taurus</i>]	gi 164452943	52 – 60 M.VVEHPEFLK.A 61 – 71 K.AGKEPGLQIWR.V 64 – 71 K.EPGLQIWR.V Glu->pyro-Glu (N-term E)	173	3

54	Alpha-fetoprotein precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735479	177 – 187 K.HVVPNEVVVQR.L 82 – 100 K.QPAGCLENQVSAFLEEICR.E 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 305 – 333 K.LPTTLELGHCIHAENDDKPEGLSPNVNR.F Carbamidomethyl (C) 470 – 488 K.QLACGEGVADLIIGHLCIR.H 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 489 – 509 R.HEENPINPGVDQCCTSSYSNR.R 2 Carbamidomethyl (C) 510 – 531 R.RPCFSSLVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C) 510 – 536 R.RPCFSSLVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C)	503	18
	Gelsolin isoform a [<i>Bos taurus</i>]	gi 164452943	52 – 60 M.VVEHPEFLK.A 61 – 71 K.AGKEPGLQIWR.V 64 – 71 K.EPGLQIWR.V Glu->pyro-Glu (N-term E) 177 – 187 K.HVVPNEVVVQR.L	173	3
55	Alpha-fetoprotein precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735479	82 – 100 K.QPAGCLENQVSAFLEEICR.E 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 305 – 333 K.LPTTLELGHCIHAENDDKPEGLSPNVNR.F Carbamidomethyl (C) 470 – 488 K.QLACGEGVADLIIGHLCIR.H 2 Carbamidomethyl (C); Gln->pyro-Glu (N-term Q) 489 – 509 R.HEENPINPGVDQCCTSSYSNR.R 2 Carbamidomethyl (C) 510 – 531 R.RPCFSSLVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C) 510 – 536 R.RPCFSSLVDETYVPPPFSDDK.F Carbamidomethyl (C)	503	18
	Gelsolin isoform a [<i>Bos taurus</i>]	gi 164452943	52 – 60 M.VVEHPEFLK.A 61 – 71 K.AGKEPGLQIWR.V 64 – 71 K.EPGLQIWR.V Glu->pyro-Glu (N-term E) 177 – 187 K.HVVPNEVVVQR.L	173	3
	Gelsolin isoform b [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736201	347 – 368 R.DPDQTDGPGLSYLSHIANVER.V 369 – 393 R.VPFDAAATLHTSTAMAAQHGMDDDDGR.G 407 – 430 K.VPVDPATYGGFYGGDSYIILYNYR.H 576 – 597 R.AQPVQVAEGSEPDSEWALGGK.A	365	12
56	ALB protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 154425704	52 - 65 F.SQYLQQCPFDEHVK.L Carbamidomethyl (C) 89 – 100 K.SLHTLFGDELCK.V Carbamidomethyl (C) 267 – 280 K.ECCHGDLLECADDR.A 3 Carbamidomethyl (C) 347 – 359 K.DAFLGSFLYEYSR.R 360 – 371 R.RHPEYAVSVLLR.L 421 – 433 K.LGEYGFQNELIVR.Y 437 – 451 R.KVPQVSTPTLVEVSR.S 469 – 482 R.MPCAEDYLSLILNR.L Carbamidomethyl (C) 508 – 523 R.RPCFSALTPDETYVPK.A Carbamidomethyl (C) 529 – 544 K.LFTFHADICTLPDTEK.Q Carbamidomethyl (C)	1041	22
57	Não identificado				
60	Endoplasmin precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 27807263	512 – 530 R.FQSSHPSDMTSLDQYVER.M 640 – 660 R.LTESPCALVASQYGWSGNMER.I + Carbamidomethyl (C)	178	7
61	Endoplasmin precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 27807263	512 – 530 R.FQSSHPSDMTSLDQYVER.M 640 – 660 R.LTESPCALVASQYGWSGNMER.I + Carbamidomethyl (C)	178	7

62	Heat shock cognate 71 kDa protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 76253709	37 – 49 R.TTPSYVAFTDTER.L 138 – 155 K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q 221 – 236 K.STAGDTHLGGEDFDNR.M	197	7
71	Ribosomal protein P1-like isoform 1 [<i>Bos taurus</i>] [<i>Bos taurus</i>]	gi 297461273 gi 262073073	34 – 49 K.AAGVNVPEFPWPLFAK.A 15 – 31 Q.EAFSLFDKDGDTITTK.E 92 – 107 R.VFDKDGNGYISAAELR.H	126 283	14 22
72	Calmodulin [<i>Bos taurus</i>]	gi 262073073	15 – 31 Q.EAFSLFDKDGDTITTK.E 92 – 107 R.VFDKDGNGYISAAELR.H	283	22
73	Não identificado				
74	Keratin 14-like, partial [<i>Bos taurus</i>]	gi 119938006	98 – 115 R.ADLEMQIENLKEELAYLR.K	226	18
75	Não identificado				
76	Toll-interacting protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 90403624	147 – 157 R.GPVYIGELPQDFLR.I	77	5
80	Secretory carrier-associated membrane protein 2 [<i>Bos taurus</i>]	gi 156120987	155 – 164 G.LLQQQEELDR.K	76	3
	Tropomyosin 4 isoform 2 [<i>Bos taurus</i>]	gi 297466575	13 – 27 K.IQVLQQQADDAEER.A 14 – 27 R.KIQVLQQQADDAEER.A 178 – 190 K.YSQKEDKYEEEIK.I	367	11
81	Tropomyosin 4 isoform 2 [<i>Bos taurus</i>]	gi 297466575	13 – 27 K.IQVLQQQADDAEER.A 14 – 27 R.KIQVLQQQADDAEER.A 178 – 190 K.YSQKEDKYEEEIK.I	367	11
82	Biliverdin reductase A [<i>Bos taurus</i>]	gi 147900301	29 – 45 R.NPHASSAFLNLIGFVSR.R 148 – 161 K.GSLLFTAAPLEEER.F	223	10
83	aldose 1-epimerase [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736588	7 – 21 R.AVFGDLPLGAGTVEK.F 31 – 46 R.VDIISWGCTITALEVK.D + Carbamidomethyl (C) 52 – 68 R.ASDVVLGFDELEGYLQK.Q	287	14
84	Aldose reductase [<i>Bos taurus</i>]	gi 60302887	42 – 62 R.HIDCAHVYQNEVGLALQAK.L Carbamidomethyl (C) 178 – 195 K.YKPAVNQIECHPYLTQEK.L Carbamidomethyl (C) 204 – 222 K.GIVVTAYSPLGSPDRPWAK.P 270 – 294 R.IAENFQVDFELDKEDMNTLLSYNR.D	578	26
	Malate dehydrogenase, cytoplasmic [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736203	221 – 230 K.GEFITTVQQR.G 299 – 310 K.VVEGLPINDFSR.E	139	6
85	Não identificado				
86	Alpha-fetoprotein precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735479	162 – 168 R.YIYEIAR.R 272 – 283 K.GNVLECLQDGER.V Carbamidomethyl (C) 355 – 361 R.FTYEYSR.R 551 – 559 K.QQFLINLVK.Q	252	5

87	Não identificado					
88	High-mobility group box 1-like [<i>Bos taurus</i>]	gi 297483924	13 – 24 K.MSSYAFFVQTCR.E + Carbamidomethyl (C) 30 – 43 K.KHPDASVNFSEFSK.K 31 – 43 K.HPDASVNFSEFSK.K 113 – 127 K.IKGEHPGLSIGDVAK.K	266	19	
89	Heat shock protein beta-1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 71037405	58 – 71 R.ALPAAAIEGPAYNR.A 76 – 90 R.QLSSGVSEIQQTADR.W + Gln->pyro-Glu (N-term Q) 93 – 108 R.VSLDVNHFAPEELTVK.T 168 – 184 K.SATQSAEITIPVTFQAR.A	517	30	
90	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 27806083	120 – 149 K.ASEFHDVNCEVVAVSVDSHFSLAWINTPR.K Carbamidomethyl (C) 219 – 249 K.AFQFVEAHGEVCPANWTPESPTIKPHPTASR.E Carbamidomethyl (C)	253	23	
91	abhydrolase domain-containing protein 14B [<i>Bos taurus</i>]	gi 157428006	33 – 42 R.FSVLLHGHIR.F 64 – 74 R.AVAIDLPLGR.S 117 – 129 Y.SLPFLTAPGSQLR.G 130 – 141 R.GYVPVAPICTDK.I + Carbamidomethyl (C)	272	21	
92	Não identificado					
93	Galectin-7-like [<i>Bos taurus</i>]	gi 119910404	58 – 70 R.LDESTVVFNTLER.G 87 – 102 R.GQPFVLLIATEEGFK.A 103 – 114 K.AVIADSEYHHFR.Y 124 – 137 R.ALEVGGDLQLELVK.I	430	39	
94	Protein disulfide-isomerase A3 precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 148230374	25 – 38 A.SDVLELTDNFEFR.I 162 – 173 K.DLFSEAHSEFLK.A 259 – 271 K.DLLIAYYDVDYEK.N 352 – 363 R.FLEDYFDGNLKR.Y 434 – 448 K.MDATANDVPSPEYEV.R + Oxidation (M)	554	13	
95	Beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein [<i>Bos taurus</i>]	gi 270483766	238 – 252 K.GSYSLSHVYTPNDVR.T 493 – 507 R.LWSPQEVTDLDDAYR.R 520 – 536 R.GIAAQPLFTGYCEHEGR.M + Carbamidomethyl (C)	292	8	
	Keratin, type II cytoskeletal 7 [<i>Bos taurus</i>]	gi 114051856	54 – 65 R.SSYGAPVGTGIR.A 152 – 162 K.QLEALQLDGGR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) 138 – 150 R.LPGIFEAQIAGLR.K 331 – 343 R.SKLEAAIADAEQR.G	295	12	
100	Placental prolactin related protein 2 precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 333440446	165 – 174 K.LQAFIESQFR.K 183 – 193 K.TIHEVSNTWSR.F 194 – 204 R.FSSMTFSDEDR.S	165	13	
101	Placental prolactin related protein 2 precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 333440446	165 – 174 K.LQAFIESQFR.K 183 – 193 K.TIHEVSNTWSR.F 194 – 204 R.FSSMTFSDEDR.S	165	13	

102	Placental prolactin related protein 2 precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 333440446	165 – 174 K.LQAFIESQFR.K 183 – 193 K.TIHEVSNTWSR.F 194 – 204 R.FSSMTFSDEDR.S	165	13
103	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 77736001	78 – 91 K.AFVDFLSDEIKEEK.K 204 – 216 K.EVSFQATGESDWK.D	177	9
104	Ras-related protein Rab-11A [<i>Bos taurus</i>]	gi 84000297	17 – 26 K.STIGVEFATR.S 37 – 47 K.AQIWDTAGQER.Y 50 – 57 R.AITSAYYR.G 71 – 79 K.HLTYENVER.W	181	17
105	Calmodulin [<i>Bos taurus</i>]	gi 262073073	15 – 31 Q.EAFSLFDKDGDTITTK.E 92 – 107 R.VFDKDGNGYISAAELR.H	283	22
106	Proactivator polypeptide [<i>Bos taurus</i>]	gi 27806447	196 – 214 N.GNVQDCIQLVTDVQEALR.T + 2 Carbamidomethyl (C) 244 – 263 K.NYINQYSEVAIQVMHM ^U QPK.E + Oxidation (M)	208	7
	Prosaposin [<i>Bos taurus</i>]	gi 120419464	196 – 214 N.GNVQDCIQLVTDVQEVLR.T 2 Carbamidomethyl (C) 244 – 263 K.NYINQYSEVAIQVMHM ^U QPK.E Oxidation (M)	98	7
107	ALB protein [<i>Bos taurus</i>]	gi 154425704	52 – 65 F.SQYLQCPFDEHVK.L Carbamidomethyl (C) 89 – 100 K.SLHTLFGDELCK.V Carbamidomethyl (C) 267 – 280 K.ECCHGDLLECADDR.A 3 Carbamidomethyl (C) 347 – 359 K.DAFLGSFLYEYSR.R 360 – 371 R.RHPEYAVSVLLR.L 421 – 433 K.LGEYGFQNELIVR.Y 437 – 451 R.KVPQVSTPTLVEVSR.S 469 – 482 R.MPCAEDYLSLILNR.L Carbamidomethyl (C) 508 – 523 R.RPCFSALTPDETYVPK.A Carbamidomethyl (C) 529 – 544 K.LFTFHADICTLPDTEK.Q Carbamidomethyl (C)	1041	22
108	Não identificado				
109	Não identificado				
110	Não identificado				
111	Não identificado				
112	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 296471574	118 – 135 K.LCEAVCPAQAITIEAEPR.A 2 Carbamidomethyl (C) 190 – 212 K.LLNNGDKWEAEIAANIQADYLYR.-	208	19
113	Não identificado				
120	Não identificado				
121	Tropomyosin 4 isoform 2 [<i>Bos taurus</i>]	gi 297466575	13 – 27 K.IQVLQQQADDAEER.A	367	11

	<i>taurus</i>]		14 – 27 R.KIQVLQQQADDAEER.A 178 – 190 K.YSQKEDKYEIEI.K		
122	Não identificado				
123	Não identificado				
124	Tropomyosin 4 isoform 2 [<i>Bos taurus</i>]	gi 297466575	13 – 27 K.IQVLQQQADDAEER.A 14 – 27 R.KIQVLQQQADDAEER.A 178 – 190 K.YSQKEDKYEIEI.K	367	11
125	Não identificado				
126	Protein disulfide-isomerase A3 precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 148230374	25 – 38 A.SDVLELTDDNFESR.I 162 – 173 K.DLFSEAHSEFLK.A 259 – 271 K.DLLIAYYDVDYK.N 352 – 363 R.FLEDYFDGNLKR.Y 434 – 448 K.MDATANDVSPYEV.R + Oxidation (M)	554	13
127	Beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein [<i>Bos taurus</i>]	gi 270483766	238 – 252 K.GSYSLSHVYTPNDV.R.T 493 – 507 R.LWSPQEVTDLDDAYR.R 520 – 536 R.GIAAQPLFTGYCEHEGR.M + Carbamidomethyl (C)	292	8
	Keratin, type II cytoskeletal 7 [<i>Bos taurus</i>]	gi 114051856	54 – 65 R.SSYGAPVGTGIR.A 152 – 162 K.QLEALQLDGG.R.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) 138 – 150 R.LPGIFEAQIAGLR.K 331 – 343 R.SKLEAAIADAEQR.G	295	12
128	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 296472532	33 – 46 K.TVQGPSSDYIFER.E 50 – 64 K.YGAHNYHPLPVALER.G 114 – 129 R.AFYNNVLGEYEEYVTK.L	269	10
129	Adenosylhomocysteinase [<i>Bos taurus</i>]	gi 77735583	9 – 19 K.VADISLAAWGR.K 95 – 103 K.AGIPVYAWK.G 143 – 151 K.YPQLLSGIR.G 187 – 196 K.SKFDNLYGCR.E + Carbamidomethyl (C) 310 – 318 K.WLNENAVEK.V 413 – 421 K.QAQYLGVSR.E 422 – 431 R.EGPFKPDHYR.Y + Glu->pyro-Glu (N-term E)	378	17
	Adenosylhomocysteinase [<i>Brucella abortus</i> str. 2308 A]	gi 237816445	79 – 97 R.WSSCNIFSTQDHAAAIAK.A + Carbamidomethyl	61	4
130	Keratin 14-like, partial [<i>Bos taurus</i>]	gi 119938006	127 – 147 R.GQVGGDVNVEMDAAPGVDSL.R.I	226	18
131	Aldose reductase [<i>Bos taurus</i>]	gi 60302887	42 – 62 R.HIDCAHVYQNEVGLALQAK.L Carbamidomethyl (C) 178 – 195 K.YKPAVNQIECHPYLTQEK.L Carbamidomethyl (C) 204 – 222 K.GIVVTAYSPLGSPDRPWAK.P 270 – 294 R.IAENFQVDFELDKEDMNTLLSYNR.D	578	26
	Malate dehydrogenase,	gi 77736203	221 – 230 K.GEFITTVQQR.G	139	6

	cytoplasmic [<i>Bos taurus</i>]		299 – 310 K.VVEGLPINDFSR.E		
132	Não identificado				
133	Não identificado				
134	Heat shock protein beta-1 [<i>Bos taurus</i>]	gi 71037405	58 – 71 R.ALPA ² AAIEGPAYNR.A 76 – 90 R ₂ QLSSGVSEIQQTADR.W + Gln->pyro-Glu (N-term Q) 93 – 108 R.VSLDVNHFAPEELTVK.T 168 – 184 K.SATQSAEITIPVTFQAR.A	517	30
135	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor [<i>Bos taurus</i>]	gi 27806083	120 – 149 K.ASEFHDVNCEVVAVSVDSHFSLAWINTPR.K Carbamidomethyl (C) 219 – 249 K.AFQFVEAHGEVCPANWTPESPTIKPHPTASR.E Carbamidomethyl (C)	253	23
136	Abhydrolase domain-containing protein 14B [<i>Bos taurus</i>]	gi 157428006	33 – 42 R.FSVLLLHGIR.F 64 – 74 R.AVAIDLPLGLR.S 117 – 129 Y.SLPFLTAPGSQLR.G 130 – 141 R.GYVPVAPIC ² TDK.I + Carbamidomethyl (C)	272	21
137	High-mobility group box 1-like [<i>Bos taurus</i>]	gi 297483924	13 – 24 K.MSSYAFFVQTCR.E + Carbamidomethyl (C) 30 – 43 K.KHPDASVNFSEFSK.K 31 – 43 K.HPDASVNFSEFSK.K 113 – 127 K.IKGEHPGLSIGDVAK.K	266	19

Anexo 3 - Lista de proteínas identificadas em cada *spot* e respectivas massas e pI (preditas e experimentais)

<i>Spot</i>	Identificação Proteínas	<i>Mr</i> pred (Da)	<i>Mr</i> exp (Da)	<i>pI</i> pred	<i>pI</i> exp
1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89233	97000	5,13	5,51
2	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89233	96581	5,13	5,56
3	Gelsolin isoform b	80681	97000	5,54	5,61
5	Gelsolin isoform b	80681	93700	5,54	6,19
6	Alpha-fetoprotein precursor	68543	89927	5,92	6,27
7	Alpha-fetoprotein precursor	68543	90317	5,92	6,16
8	ALB protein	69248	85933	5,95	6,26
9	ALB protein	69248	84825	5,95	6,33
10	ALB protein	69248	88767	5,95	6,38
11	ALB protein	69248	87244	5,95	6,43
12	Alpha-fetoprotein precursor	68543	84642	5,92	6,46
13	Inositol-3-phosphate synthase 1	60723	72434	5,68	5,88
14	Cytokeratin 8	42369	59392	5,13	5,90
15	Cytokeratin 8	42369	58985	5,13	5,94
16	Cytokeratin 8	42369	57384	5,13	5,91
17	Cytokeratin 8	42369	59120	5,13	6,02
18	Creatine kinase B-type	42692	51638	5,47	6,23
18	Cathepsin D	44477	51638	7,56	6,23
18	Beta actin	41845	51638	5,30	6,23
19	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	28167	47875	5,25	5,92
19	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	38217	47875	5,43	5,92
20	Prostaglandin reductase 2	38375	44677	5,34	5,89
21	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	33307	46468	5,34	5,99
22	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	33307	44870	5,34	6,00
25	F-actin-capping protein subunit beta	33720	34657	6,02	5,92
26	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor	35387	34210	8,38	6,31
29	Transgelin-2	22412	15948	8,39	6,04
29	Hemoglobin subunit beta	15849	15948	6,51	6,04
30	Transthyretin precursor	15717	16969	5,91	6,47
31	Dynein light chain roadblock-type 1	10969	14815	6,58	6,54
43	LDLR chaperone MESD	25960	19871	6,08	6,39
45	Similar to BOLA-like protein 2 isoform 1	10094	15274	5,78	6,29
51	Alpha-actinin-4	104865	95369	5,27	5,81
51	Endoplasmin precursor	92369	95369	4,76	5,81
53	Alpha-fetoprotein precursor	68543	94222	5,92	5,87
53	Gelsolin isoform a	85634	94222	5,86	5,87
54	Alpha-fetoprotein precursor	68543	93766	5,92	5,93
54	Gelsolin isoform a	85634	93766	5,86	5,93
55	Alpha-fetoprotein precursor	68543	93540	5,92	6,00
55	Gelsolin isoform a	85634	93540	5,86	6,00

55	Gelsolin isoform b	80681	93540	5,54	6,00
56	ALB protein	69248	93994	5,95	6,11
60	Endoplasmin precursor	92369	96765	4,76	5,65
61	Endoplasmin precursor	92369	97235	4,76	5,71
62	Heat shock cognate 71 kDa protein	71226	94679	5,37	5,71
71	Ribosomal protein P1-like isoform 1	11567	20332	4,26	4,06
71	Calmodulin	16836	20332	4,09	4,06
72	Calmodulin	16836	18899	4,09	4,07
74	Keratin 14-like, partial	24618	58862	4,72	4,24
76	Toll-interacting protein	30088	34142	5,30	5,59
80	Secretory carrier-associated membrane protein 2	43978	34391	9,03	4,81
80	Tropomyosin 4 isoform 2	28966	34391	5,02	4,81
81	Tropomyosin 4 isoform 2	28966	34895	5,02	4,67
82	Biliverdin reductase A	33622	43711	5,85	6,69
84	Aldose reductase	36028	39829	5,88	6,91
84	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36415	39829	6,16	6,91
83	Aldose 1-epimerase	37591	42644	5,89	6,77
86	Alpha-fetoprotein precursor	68543	36769	5,92	6,78
88	High-mobility group box 1-like	24921	31657	5,51	6,85
89	Heat shock protein beta-1	22665	28696	5,77	6,82
90	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	28177	27786	7,15	6,73
91	Abhydrolase domain-containing protein 14B	22441	26975	6,05	6,82
93	Galectin-7-like	15381	17261	6,08	6,80
94	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	56894	70323	6,38	6,87
95	Beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein	61223	66145	7,64	6,89
95	Keratin, type II cytoskeletal 7	51546	66145	5,79	6,89
100	Placental prolactin related protein 2 precursor	27665	43618	7,57	4,21
101	Placental prolactin related protein 2 precursor	27665	43561	7,57	4,30
102	Placental prolactin related protein 2 precursor	27665	43561	7,57	4,42
103	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor	30587	33810	4,75	4,31
104	Ras-related protein Rab-11A	24454	28043	6,12	4,06
105	Calmodulin	16836	21786	4,09	4,08
106	Proactivator polypeptide	58013	13680	5,08	4,30
106	Prosaposin	58129	13680	5,13	4,30
107	ALB protein	69248	60632	5,95	6,94
112	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8,mitochondrial precursor	23881	26973	6,45	5,68
121	Tropomyosin 4 isoform 2	28966	33898	5,02	4,82
124	Tropomyosin 4 isoform 2	28966	40189	5,02	4,84
126	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	56894	71176	6,38	6,87
127	Beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein	61223	65840	7,64	6,87
127	Keratin, type II cytoskeletal 7	51546	65840	5,79	6,87
128	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor	48088	54498	6,24	6,80
129	Adenosylhomocysteinase	47607	55029	5,88	6,87
130	Keratin 14-like, partial	24618	42943	4,72	6,97
131	Aldose reductase	36028	39413	5,88	6,93

131	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36415	39413	6,16	6,93
134	Heat shock protein beta-1	22665	28880	5,77	6,83
135	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	28177	27778	7,15	6,73
136	Abhydrolase domain-containing protein 14B	22441	27067	6,05	6,83
137	High-mobility group box 1-like	24921	31274	5,51	6,95

Anexo 4 - Parceiros Funcionais Preditos das proteínas identificadas em amostras de células trofoblásticas bovinas infectadas na rede de interação (Figura 18)

Parceiros Funcionais Preditos	
● NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase); Core subunit [...] (213 aa)
● NDUFA2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa; Accessory subunit of the mitochond [...] (99 aa)
● RAB11FIP2	RAB11 family interacting protein 2 (class I); A Rab11 effector protein acting in the regulation [...] (512 aa)
● NDUFS2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase); Core subunit [...] (463 aa)
● NDUFV1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa; Core subunit of the mitochondrial membra [...] (464 aa)
● PRLR	prolactin receptor; This is a receptor for the anterior pituitary hormone prolactin (PRL). Isof [...] (622 aa)
● NDUFS3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase); Core subunit [...] (264 aa)
● NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase); Core subunit [...] (727 aa)
● RPLP0	ribosomal protein, large, P0; Ribosomal protein P0 is the functional equivalent of E.coli prote [...] (317 aa)
● RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I); A Rab11 effector protein involved in the endosoma [...] (1283 aa)
● NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa; Core subunit of the mitochondrial membra [...] (249 aa)
● RAB11FIP3	RAB11 family interacting protein 3 (class II) (756 aa)
● RPLP2	ribosomal protein, large, P2; Plays an important role in the elongation step of protein synthes [...] (115 aa)
● MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2; Its physiological substrate seems [...] (400 aa)
● MT-ND1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (EC 1.6.5.3)(NADH dehydrogenase subunit 1); Core subunit [...] (318 aa)
● POU1F1	POU class 1 homeobox 1; Transcription factor involved in the specification of the lactotrope, s [...] (317 aa)
● RAB11FIP5	RAB11 family interacting protein 5 (class I); Rab effector involved in protein trafficking from [...] (653 aa)
● CALR	calreticulin; Molecular calcium binding chaperone promoting folding, oligomeric assembly and qu [...] (417 aa)
● MT-ND5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 (EC 1.6.5.3)(NADH dehydrogenase subunit 5); Core subunit [...] (603 aa)
● CANX	calnexin; Calcium-binding protein that interacts with newly synthesized glycoproteins in the en [...] (592 aa)
● CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta; CaM-kinase II (CAMK2) is a prominent kinas [...] (666 aa)
● OTC	ornithine carbamoyltransferase (354 aa)
● MAPKAPK5	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5; Mediates stress-induced small heat [...] (473 aa)
● IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1; Binds to activated CDC42 but does not stimulat [...] (1657 aa)
● MT-ND4	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (EC 1.6.5.3); Core subunit [...] (459 aa)

● RPL12	ribosomal protein L12; Binds directly to 26S ribosomal RNA (165 aa)
● IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1; Binds to the IL-1 type I receptor following IL-1 en [...] (712 aa)
● ADCY8	adenylate cyclase 8 (brain); This is a membrane-bound, calcium-stimulable adenylyl cyclase. May [...] (1251 aa)
● RPS3	ribosomal protein S3 (243 aa)
● TLR2	toll-like receptor 2; Cooperates with LY96 to mediate the innate immune response to bacterial l [...] (784 aa)
● PDE1A	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent; Has a higher affinity for cGMP than for cAMP (545 aa)
● MYLK	myosin light chain kinase; Calcium/calmodulin-dependent enzyme implicated in smooth muscle cont [...] (1914 aa)
● JAK2	Janus kinase 2; Plays a role in leptin signaling and control of body weight (By similarity). Ty [...] (1132 aa)
● IL1R1	interleukin 1 receptor, type I; Receptor for interleukin-1 alpha (IL-1A), beta (IL-1B), and int [...] (569 aa)
● KRT5	keratin 5 (590 aa)
● RPS17	ribosomal protein S17 (135 aa)
● PPP3CA	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform; Calcium-dependent, calmo [...] (521 aa)
● NDUFS4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase); Accessory su [...] (175 aa)
● RPS10	ribosomal protein S10 (165 aa)
● ARG1	arginase, liver (322 aa)
● SORD	sorbitol dehydrogenase (357 aa)
● CABIN1	calcineurin binding protein 1; May be required for replication-independent chromatin assembly. [...] (2220 aa)
● RPS23	ribosomal protein S23 (143 aa)
● RPS29	ribosomal protein S29 (67 aa)
● F12	coagulation factor XII (Hageman factor); Factor XII is a serum glycoprotein that participates i [...] (615 aa)
● NDUFA7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 14.5kDa; Accessory subunit of the mitoch [...] (113 aa)
● CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma; CaM-kinase II (CAMK2) is a prominent kina [...] (556 aa)
● ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1; Intracellular channel that mediates calcium relea [...] (2710 aa)
● GAP43	growth associated protein 43; This protein is associated with nerve growth. It is a major compo [...] (274 aa)
● NDUFA6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa; Accessory subunit of the mitochon [...] (154 aa)
