

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Monique Ferreira Silva

Papel do Sistema de secreção do tipo 4 e proteína BtpA de
Brucella abortus no estabelecimento do processo inflamatório em
modelo de implante de matriz sintética

Belo Horizonte - MG
2019

Monique Ferreira Silva

Papel do Sistema de secreção do tipo 4 e proteína BtpA de
Brucella abortus no estabelecimento do processo inflamatório em
modelo de implante de matriz sintética

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora Profa: Tatiane Alves da Paixão
Co-Orientador Prof.: Renato de Lima Santos

Belo Horizonte - MG
2019

- 043 Silva, Monique Ferreira.
Papel do sistema de secreção do tipo 4 e proteína BtpA de *Brucella abortus* no estabelecimento do processo inflamatório em modelo de implante de matriz sintética [manuscrito] / Monique Ferreira Silva. - 2019.
58 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profª. Tatiane Alves da Paixão. Coorientador: Prof. Renato de Lima Santos.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Patologia. 2. *Brucella abortus*. 3. Sistemas de Secreção Tipo IV. 4. Inflamação. Paixão, Tatiane Alves da. II. Santos, Renato de Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

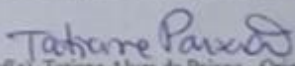
FOLHA DE APROVAÇÃO

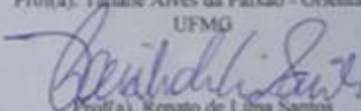
Papel do Sistema secreção do tipo 4 e proteína BtpA de *Brucella abortus* no estabelecimento do processo inflamatório em modelo de implante de matriz sintética

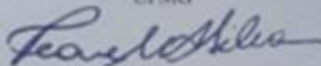
MONIQUE FERREIRA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 15 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Tariane Alves da Paixão - Orientador
UFMG


Prof(a). Renato de Lima Santos
UFMG


Prof(a). Teíze Milagres Augusto da Silva
Instituto Federal Catarinense


Prof(a). Paula Peixoto Campos Lopes
UFMG

Belo Horizonte, 15 de fevereiro de 2019.

"A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original."
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me abençoar durante essa jornada.

Aos meus pais, Marilene e Valmiro, agradeço por todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Samuel, gostaria de agradecer por ser um grande companheiro, que me apoiou e incentivou durante todo esse tempo.

Agradeço a professora Tatiane Alves da Paixão, por me orientar desde a iniciação científica até agora no mestrado. Agradeço pela oportunidade, pelos ensinamentos, disponibilidade, dedicação e paciência durante esses anos.

Ao professor Renato de Lima Santos gostaria de agradecer por todos os ensinamentos concedidos que permitiram ampliar meus conhecimentos.

Ao Diego, Camila, Fabíola e Luciana, gostaria de agradecer pela ajuda essencial em todos os momentos do mestrado.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, Claudia, Thaynara, Frank, Andressa, Alexandre, Daniel, Ayisa e Pâmela, pelo carinho, companheirismo e por toda ajuda na realização deste trabalho.

A professora Mônica Diniz Ferreira gostaria de agradecer por participar da minha banca de defesa e por fornecer a esponja utilizada no trabalho.

Agradeço a professora Paula Campos Peixoto, que além de participar da minha banca de defesa, permitiu que eu utilizasse o laboratório de Apoptose. Assim como, também agradeço ao Celso pela ajuda no meu trabalho com os ELISA.

Obrigado a Teane Milagres Augusto da Silva e a Juliana Pinto da Silva Mol, por aceitarem compor a banca de avaliação de minha dissertação. Todos os trabalhos que vocês fizeram ao longo do tempo, contribuiu para o meu crescimento profissional.

Agradeço a todos do laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária que me auxiliaram durante essa jornada.

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

Meu sincero agradecimento!

RESUMO

A brucelose humana ocasionada por bactérias do gênero *Brucella* spp. é considerada uma doença zoonótica de caráter crônico debilitante. *Brucella abortus* é uma bactéria Gram-negativa, intracelular facultativa, considerada endêmica em muitos países, responsável por infecções crônicas em bovinos e em seres humanos. Após a infecção por *Brucella* spp., a resposta imunológica do hospedeiro é ativada, porém, diversos fatores de virulência contribuem para sua evasão do sistema imunológico e persistência no hospedeiro favorecendo o estabelecimento da infecção crônica. Embora *Brucella* spp. induza uma resposta inflamatória insidiosa, pouco se sabe sobre a influência da bactéria no estabelecimento da inflamação aguda *in vivo*, em particular no modelo de esponja sintética. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o processo inflamatório agudo induzido pela infecção por *B. abortus* e a influência do sistema de secreção tipo 4 (SST4) e da proteína BtpA no processo inflamatório sete e 14 dias após implante de matriz sintética em camundongos. Este é o primeiro trabalho que estuda o perfil inflamatório induzido pela infecção por *B. abortus* 2308 em modelo *in vivo* de biomaterial sintético. *B. abortus* 2308, *B. abortus* $\Delta btpA$ foram capazes de sobreviver e se multiplicar nesse modelo enquanto *B. abortus* $\Delta virB2$ foi atenuada, confirmando sua incapacidade de persistir *in vivo*. *B. abortus* 2308 e $\Delta btpA$ foram capazes de modular a resposta inflamatória na esponja de forma distinta da cepa *B. abortus* $\Delta virB2$. Observamos que *B. abortus* 2308 e $\Delta btpA$ induziu menor influxo de células inflamatórias, produção de mediadores inflamatórios e formação de tecido fibrovascular aos 14 dias pós implante comparada aos grupos controle ou infectados com *B. abortus* $\Delta virB2$. *B. abortus* 2308 tem a capacidade de inibir a inflamação *in vivo* e o SST4, mas não BtpA, influencia no curso do processo inflamatório agudo no modelo de matriz sintética.

Palavras-chave: *Brucella abortus*, Sistema secreção do tipo 4, BtpA, inflamação, matriz sintética

ABSTRACT

Human brucellosis caused by bacteria of the genus *Brucella* spp. is considered a debilitating chronic zoonotic disease. *Brucella abortus* is a Gram-negative, intracellular, facultative bacterium, considered endemic in many countries, and it is responsible for bovine and human chronic infections. After *Brucella* spp. infection, the host immune response is activated, but several virulence factors contribute for bacterium evasion of the immune system and persistence in the host favoring the establishment of chronic infection. Although *Brucella* spp. induces an insidious inflammatory response, little is known about the influence of bacteria on the establishment of acute inflammation *in vivo*, particularly in the synthetic sponge model. Thus, the goal of this study was to evaluate the acute inflammatory process induced by *B. abortus* infection and the influence of the Type 4 Secretory System (T4SS) and BtpA protein in the inflammatory process at 7 and 14 days after implantation of synthetic matrix in mice. This is the first study of the inflammatory profile induced by *B. abortus* 2308 infection in the *in vivo* model of synthetic biomaterial. *B. abortus* 2308, *B. abortus* $\Delta btpA$ were able to survive and replicate in this model while *B. abortus* $\Delta virB2$ was attenuated, confirming its inability to cause persistent infection *in vivo*. *B. abortus* 2308 and $\Delta btpA$ were able to modulate the inflammatory response in sponge differently than $\Delta virB2$. We observed that *B. abortus* 2308 and $\Delta btpA$ induced lower influx of inflammatory cells, production of inflammatory mediators and formation of fibrovascular tissue at 14 days post-implant compared to the control or $\Delta virB2$ -infected groups. *B. abortus* 2308 has the ability to inhibit inflammation *in vivo* and T4SS, but not BtpA, influences the course of the acute inflammatory process in the synthetic matrix model.

Key words: *Brucella abortus*, Type 4 Secretion System, BtpA, inflammation, synthetic matrix

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tráfego intracelular de *Brucella* sp. *Brucella* sp. é capaz de sobreviver e multiplicar no **24**

citoplasma da célula do hospedeiro, ao evitar a fusão do vacúolo contendo *Brucella* (VCB) com o lisossomo e direcionando para sítio de multiplicação. A) (1) *Brucella abortus* é fagocitada pelo macrófago, (2) formação do vacúolo contendo *Brucella* (VCB) com marcadores endossomais, (3) a acidificação do VCB, ativa o operon *virB* e a expressão do SST4 inibe sua fusão com o lisossomo, (4) o VCB adquire marcadores de retículo endoplasmático, (5) e ocorre a multiplicação de *Brucella*. B) (1) A cepa mutante $\Delta virB2$ é fagocitada por macrófagos, (2) ocorre a formação do VCB com marcadores endossomais, (3) VCB interage com o lisossomo degradando a cepa mutante $\Delta virB2$.

Figura 2: Modelo para subversão da imunidade inata por BtpA de *Brucella abortus*. BtpA é **27**

liberada no citosol do hospedeiro, inibe a sinalização do TLR2, TLR4 e TLR9 ao se ligar na proteína adaptadora (TIRAP), impedindo a ligação do MyD88, bloqueando a transcrição dos fatores de transcrição nuclear NF- κ B e AP-1 e consequentemente inibindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias.

Figura 3: Delineamento experimental. No dia 0, foi realizado o implante de duas esponjas no tecido **30**

subcutâneo da região cervical dos camundongos. Vinte quatro horas pós implante, os camundongos foram inoculados diretamente na esponja com 50 μ l de PBS (MOCK) como (controle) ou 50 μ l de 10⁴ UFC de *B. abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ em cada esponja. Nos dias sete (n=5) e 14 (n=5) pós inoculação foi realizada a eutanásia dos camundongos e esponja e baço foram coletados para análise bacteriológica, e esponja para análise histológica e bioquímica da resposta inflamatória.

Figura 4: Recuperação bacteriana no baço e esponja. Os camundongos foram infectados com 10⁴ **36**

UFC/esponja de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ ou PBS (MOCK) (controle) (n=5) após 24 horas do implante o UFC foi determinado no baço (A-B) e esponja (C-D) nos tempos de sete (A-C) e 14 (B-D) dias após implante da esponja. Linha tracejada representa limite de detecção do teste. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. A imunomarcagem de *B. abortus* (E) nas esponjas mostrou maior quantidade de bactéria nos grupos *B. abortus* 2308 e *B. abortus* $\Delta btpA$ com localização predominantemente intracelular, aumento 40X. Os resultados foram analisados utilizando o teste de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Pontos representam os camundongos e as barras a média/SD.

Figura 5: Análise de citocina pró e anti-inflamatória. Esponjas implantadas em camundongos (n = 37 5) foram infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle. Sete e 14 dias pós implante, os camundongos foram eutanasiados e a esponja colhida para análise da secreção de IFN- γ (A e B) e IL-10 (C e D) medida por ELISA. * $P < 0.05$, *** $P < 0,001$. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

Figura 6: Níveis de citocinas em implantes de esponja. Esponjas implantadas em camundongos 38 (n=5) foram infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle. Sete e 14 dias pós implante, os camundongos foram eutanasiados e a esponja colhida para análise da secreção de (A - B) TNF- α , (C- D) TGF- $\beta 1$. Foi considerado diferença significativa, quando o * $P < 0.05$. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Figura 7: Aspectos microscópicos da esponja. Esponjas infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella* 40 *abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle, foram colhidas para análise histopatológica. Imagens representativas do centro da esponja (A) e do tecido fibrovascular periférico (B) com 7 e 14 dpie (H&E, aumento de 20x), mostrando aumento de celularidade no centro da esponja dos diferentes grupos. Análise de escore de inflamação (C e D) e tecido de granulação (E e F) dos quatro grupos com 7 e 14 dpie.

Figura 8: Formação de tecido fibrovascular na esponja. Esponjas implantadas em camundongos 41 (n=5) e infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle, foram colhidas com 7 (A) e 14 dpie (B) para mensuração morfométrica da área da esponja ocupada por capsula e tecido inflamatório associada a tecido conjuntivo jovem vascularizado. * $P < 0.05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Os resultados foram analisados utilizando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey

Figura 9: Quantificação de neutrófilos na esponja. Esponjas implantadas em camundongos (n=5) 42 e infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT) , *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle foram avaliadas aos sete e 14 dpie quanto a atividade da enzima mieloperoxidase (A e B), a concentração da citocina KC (C e D) e marcação imunoistoquímica de neutrófilos (40x) (E) e contagem morfométrica pelo software ImageJ (F e G). Resultado considerados significativo quando o * $P < 0.05$. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

Figura 10: Quantificação de macrófagos na esponja. Esponjas implantadas em camundongos (n=5) **44** e infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle foram avaliadas aos 7 e 14 dpie quanto a atividade da enzima N-acetil-b-D-glicosaminidase (A e B), a concentração da citocina CCL2 (C e D) e a contagem de células gigantes multinucleadas (seta amarela) por campo foi realizada em H&E, aumento de (60x) (E e F). Resultado considerado significativo quando o $*P < 0.05$. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Cepas mutantes utilizadas no trabalho	32
Tabela 2. Características dos anticorpos para a imunoistoquímica	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Proteína ativadora-1
BMDC	Células dendríticas derivadas da medula óssea
BMMs	Macrófagos da medula óssea
BtpA	<i>Brucella</i> Tir protein A
CβG	Beta 1,2 glucanos cíclicos
CCL2	Ligante de quimiocina C-C Motif 2
CEUA	Comitê de ética em pesquisa animal
CO₂	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina 3,3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DPI	Dias pós infecção
DPIE	Dias pós implante esponja
EEA-1	Antígeno endossômico inicial 1
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
HE	Hematoxilina-eosina
HRP	Enzima peroxidase de rábano
IFN-γ	Interferon gamma
IKK	Complexo quinase IKB
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IRAK	Quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1
IRF1	Fator regulador do interferon 1
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
LAMP-1	Proteína de membrana associada ao lisossoma 1
LPS	Lipopolissacarídeo
MAL	Adaptador MyD88
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógeno

MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Resposta primária de diferenciação mieloide
NAG	<i>N</i> -acetil- β - <i>D</i> -glicosaminidase
NF-kβ	Fator de transcrição nuclear kappa B
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDI	Isomerase de dissulfeto de proteína
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
Rab5	Rabaptin-5
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Sec61 β	Proteína de transporte de proteína Sec61 subunidade beta
SST4	Sistema de secreção tipo IV
VCB	Vacúolo contendo <i>Brucella</i>
TAK1	Quinase1 associada a TGF-beta
TGF- β1	Fator de crescimento transformador beta 1
Th1	Tipo T helper 1
TIR	Receptor Toll-interleucina 1
TIRAP	Receptor contendo domínio toll-interleucina 1
TLRs	Receptor Toll-like
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAM	Molécula de adaptador relacionada ao adaptador TRIF
TRAF 6	Receptor de TNF associado à ubiquitina ligase
TRIF	Interferon indutor de adaptador contendo um domínio TIR
TSA	Ágar de soja tripticase
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Wt	Tipo selvagem

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
Características gerais da brucelose	18
Infecção por <i>Brucella abortus</i>	19
Patogênese e fatores de virulência de <i>Brucella</i> spp.	20
Resposta imune inata induzida por <i>Brucella</i> spp.	25
Modelo experimental de implante sintético (esponja)	28
OBJETIVO GERAL	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
Delineamento experimental	30
Preparo e implantação dos discos de Matriz Sintética (esponja)	31
Cultivo infecção das esponjas por <i>Brucella abortus</i>	31
Extração dos implantes	32
Contagem bacteriana	32
Avaliação microscópica das esponjas	32
Imunoistoquímica	32
Análise morfométrica	33
Análise bioquímica da atividade de mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase	33
Mensuração por ELISA de citocinas e quimiocinas dos implantes de esponja	34
Análise estatística	35
RESULTADOS	35
Recuperação bacteriana em baço e esponja dos camundongos infectados	35
Mensuração de citocinas inflamatórias	37
Avaliação microscópica do processo inflamatório na esponja	39
Quantificação de neutrófilos	41
Quantificação de macrófagos ativados	43
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

INTRODUÇÃO

A brucelose humana ocasionada por bactérias do gênero *Brucella* spp. é considerada uma doença zoonótica e de caráter crônico debilitante (Paixão et al., 2009; Silva et al., 2011; Byndloss e Tsolis, 2016). Dentre as espécies clássicas de *Brucella* sp., as mais patogênicas aos seres humanos são *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella canis*, enquanto *Brucella ovis* é considerada apatogênica para o homem (Byndloss e Tsolis, 2016). A brucelose está amplamente distribuída no mundo, com mais de 500.000 casos novos anualmente, sendo identificado mais de 1000 casos por milhão de habitantes em áreas endêmicas (Skalsky et al., 2008; Atluri et al., 2011; Dean et al., 2012; Olsen e Palmer, 2014; Tuon et al., 2017; Lemos et al., 2018). As principais manifestações clínicas descritas estão relacionadas com sinais e sintomas inespecíficos, podendo agravar e resultar em complicações clínicas, como endocardite, meningite ou meningoencefalite e principalmente alterações musculoesqueléticas, como a artrite e osteomielite (Mantur et al., 2007; Paixão et al., 2009; Dean et al., 2012; Tuon et al., 2017).

B. abortus é uma bactéria Gram-negativa, intracelular facultativa, considerada endêmica em muitos países, responsável por infecções crônicas em seres humanos (Tuon et al., 2017; Lemos et al., 2018). *B. abortus* é o agente da brucelose bovina, doença responsável por perdas econômicas devido a falhas reprodutivas decorrentes de abortos e nascimentos de bezerros fracos (Carvalho Neta et al., 2010; Olsen e Palmer, 2014). A infecção por *B. abortus* é adquirida pelo homem através do contato direto com animais infectados ou pelo consumo de produtos lácteos não pasteurizados (Atluri et al., 2011; Olsen e Palmer, 2014).

Após a infecção, a resposta imunológica do hospedeiro é ativada contra a bactéria, porém, diversos fatores de virulência contribuem para sua sobrevivência e persistência do patógeno no hospedeiro (Jong et al., 2010). Um importante fator de virulência do gênero é o sistema de secreção tipo IV (SST4), que é codificado pelo operon *virB*. SST4 tem a função de secretar proteínas bacterianas efectoras para o citoplasma da célula hospedeira, cujo propósito é alterar a maturação do vacúolo contendo *Brucella* sp. (VCB), inibindo sua fusão com o lisossomo e permitindo a multiplicação intracelular de *Brucella* sp. quando o VCB alcança o retículo endoplasmático (RE) (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Celli et al., 2003).

Receptores Toll-like (TLRs) caracterizados pela presença de um domínio intracelular Toll/ interleucina-1 (IL-1) (TIR), são receptores responsáveis por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e desencadear uma cascata de sinalização intracelular que culmina com ativação da resposta imunológica inata (Cirl et al., 2008; Salcedo et al., 2013). *B.abortus* possui a capacidade de interferir na sinalização via TLR ao produzir proteínas homólogas ao domínio TIR, BtpA e BtpB (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008; Salcedo et al., 2013; Hielpos et al., 2017). BtpA, descrita previamente como Btp1 ou TcpB (Cirl et al., 2008; Salcedo et al., 2008), é capaz de impedir a sinalização via TLR (*Toll like receptors*) ao se ligar diretamente ao adaptador MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), bloqueando ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) e consequentemente inibindo produção de mediadores inflamatórios da resposta imune inata (Cirl et al., 2008; Salcedo et al., 2008; Salcedo et al., 2013).

Muitos modelos *in vitro* e *in vivo* tem sido utilizados para o estudo dos principais fatores de virulência e sua influência na resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção por *Brucella* spp. (Jong et al., 2010), no entanto, ainda pouco se sabe da resposta inflamatória aguda desencadeada no tecido após infecção por *Brucella* sp. O implante de esponjas sintéticas de poliéster-poliuretano em animais de experimentação é um modelo amplamente utilizado no estudo da angiogênese, fibroplasia, regeneração e resposta inflamatória (Campos et al., 2011; Marques et al., 2011; Lima et al., 2014; Socarrás et al., 2014). Entretanto, este modelo ainda não foi explorado para avaliar curso da infecção por patógenos. Estudos demonstram que os fatores de virulência de *Brucella* sp. podem favorecer o estabelecimento da infecção crônica induzindo resposta inflamatória insidiosa (Byndloss e Tsolis, 2016). Contudo, pouco se sabe sobre a influência destes fatores de virulência no estabelecimento da inflamação aguda *in vivo*, em particular, no modelo de esponja sintética.

O esclarecimento da resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *Brucella* spp. pode contribuir para o melhor entendimento do estabelecimento e a evolução das lesões crônicas da doença, e que, a longo prazo, pode auxiliar no desenvolvimento de terapia mais eficientes. Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar o processo inflamatório agudo induzido pela infecção por *B. abortus* e a influência do SST4 e da proteína BtpA no processo utilizando-se o modelo de implante de matriz sintética em camundongos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Características gerais da brucelose

A brucelose é uma doença infecciosa que acomete animais e humanos, causada por bactérias do gênero *Brucella* (Olsen e Palmer, 2014; Byndloss e Tsolis, 2015). *Brucella* sp. são cocobacilos Gram-negativos, intracelulares facultativos, não esporulados, não encapsulados, imóveis, aeróbios obrigatórios, sendo que algumas espécies necessitam de dióxido de carbono para crescimento. O lipolissacarídeo (LPS) é o maior componente da membrana externa de *Brucella* spp. (Cardoso et al., 2006) e baseado na morfologia da colônia, a bactéria pode ser classificada como lisa ou rugosa, sendo que o fenótipo liso é caracterizado pela presença da cadeia O presente na maioria das espécies como *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* (Olsen e Palmer, 2014), e o fenótipo rugoso caracterizado pela ausência da cadeia O, apresentado por *B. canis* e *B. ovis* (Hollett, 2006).

A brucelose causa problema de saúde animal, devido a perdas econômicas associadas ao aborto, falha reprodutiva e sacrifício de animais infectados (Santos et al., 2013), como também problemas de saúde pública por provocar uma doença com quadros de febre ondulante que podem agravar e ocasionar lesões inflamatórias crônicas graves (Mantur et al., 2007; Dean et al., 2012; Tuon et al., 2017). A brucelose humana é amplamente distribuída no mundo, com mais de 500.000 casos novos anualmente (Pappas et al., 2006). Porém, esse número pode estar subestimado, devido principalmente ao tempo de incubação da bactéria, que pode variar de meses a anos e a forma inespecífica de apresentação da doença (Mantur et al., 2007; Atluri et al., 2011).

Brucella foi descrita pela primeira vez por David Bruce em 1887, que identificou a bactéria *Micrococcus melitensis* como causador da febre de Malta. O gênero possui seis espécies clássicas com seus respectivos hospedeiros preferenciais: *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. suis* (suínos), *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (cães), *B. ovis* (ovinos) e *B. neotomae* (ratos do deserto) (Olsen e Palmer, 2014). As espécies consideradas mais patogênicas aos seres humanos são *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*, e por último *B. canis*, enquanto *B. ovis* não é considerada patogênica para o homem (Xavier et al., 2010) e o potencial zoonótico de *B. neotomae* foi recentemente reconhecida (Suárez-Esquivel et al., 2017). Novas espécies têm sido descritas com potencial zoonótico nos últimos anos como duas espécies que infectam mamífero

marinhos: *B. pinnipedialis* e *B. ceti*, sendo que ambas podem ocasionar infecções nos seres humanos (Guzmán-Verri et al., 2012); e *B. inopinata* isolada de um implante mamário em uma paciente que apresentava sinais de brucelose (Scholz et al., 2010). Outras espécies de *Brucella* também foram identificadas ao longo dos anos, como *B. microti* (ratazana), *B. papionis* (babuínos) e *B. vulpis* (raposas) (Scholz et al., 2016).

Infecção por *Brucella abortus*

Brucella abortus é o principal agente da brucelose bovina, embora outras espécies como *B. melitensis* e *B. suis* também possam infectar bovinos. A brucelose bovina possui distribuição mundial, com sete biovariedades de *B. abortus* (biovares 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9) identificados, sendo o biovar 1 mais comum (Carvalho Neta et al., 2010). No Brasil existe um programa nacional de controle da brucelose bovina baseado na vacinação obrigatória com as vacinas vivas atenuadas, a B19 e a RB51 e o sacrifício dos animais soropositivos (Brasil, 2006).

As principais manifestações clínicas resultantes da infecção por *B. abortus* em bovinos envolvem problemas reprodutivos, como o aborto e o nascimento de bezerros fracos (Lage et al., 2008; Xavier et al., 2009). Nos machos, a infecção por *B. abortus* pode causar alterações como orquite, vesiculite e epididimite (Corbel, 1997; Hull e Schumaker, 2018) e infecções crônicas como bursite e artrite também podem ocorrer (Xavier et al., 2009). A transmissão ocorre por via oral ou via aerógena, através da eliminação de *B. abortus* no leite, na urina e fetos abortados. O hábito de lambar e cheirar os bezerros recém-nascidos e os fetos abortados é uma importante forma de transmissão entre bovinos (Lage et al., 2008).

A brucelose humana é caracterizada por sinais e sintomas inespecíficos na fase aguda, como: febre ondulante, cefaleia, mialgia, fadiga e sudorese (Mantur et al., 2007; Lawinsky et al., 2010), que podem persistir e progredir para infecções crônicas graves fatais que podem estar associados a endocardite, esplenomegalia, hepatomegalia, meningite ou meningoencefalite e lesões debilitantes como as alterações musculoesqueléticas, que englobam a artrite e osteomielite (Mantur et al., 2007; Krueger et al., 2014). A infecção em mulheres gestantes por *Brucella* spp. pode ocasionar aumento do risco de aborto ou transmissão intrauterina para o feto (Khan et al., 2001).

A brucelose humana é considerada uma zoonose de caráter ocupacional (Mantur et al., 2007). Diversos fatores, como estado sanitário dos animais domésticos, hábitos alimentares, costumessociais e estado socioeconômico, podem influenciar no risco de transmissão ao homem (Mantur et al., 2007; Olsen e Palmer, 2014). Profissionais que tem contato direto com animais domésticos como médicos veterinários, fazendeiros, trabalhadores rurais, proprietários e magarefes e laboratoristas são os mais expostos (Mantur et al., 2007; Atluri et al., 2011; Olsen e Palmer, 2014). A via oral é a principal via da transmissão da doença em seres humanos em decorrência ao consumo de produtos lácteos não pasteurizados. A transmissão também ocorre pelas vias conjuntival e respiratória através do contato direto com animais infectados ou devido inoculação acidental de vacinas atenuadas (Atluri et al., 2011; Byndloss e Tsolis, 2015). Exposição laboratorial é outra forma importante de aquisição de brucelose, podendo ser transmitida por aerossol ou inoculação acidental (Traxler et al., 2013). Estas características fazem com que *Brucella* sp. seja classificado como agente de bioterrorismo e deve ser manipulada em laboratórios de biossegurança nível 3 (Robichaud et al., 2004; Yagupsky e Baron, 2005).

O diagnóstico laboratorial da brucelose pode ser feito através de testes diretos, como a cultura, detecção do agente pela reação em cadeia da polimerase ou imunoistoquímica ou através de testes indiretos, como o teste de soroaglutinação Rosa Bengala, soroaglutinação/SAT, ELISA, dentre outros (Mol et al., 2012). Para o diagnóstico da brucelose humana, não há um protocolo de diagnóstico definido, pois os sinais clínicos inespecíficos, dificultam o diagnóstico e como consequência, dificulta o tratamento (Brasil, 2006; Falagas e Bliziotis, 2006). O tratamento envolve uma combinação de antibióticos por longo período, sendo feita a combinação de doxiciclina com rifampicina ou gentamicina como principal protocolo de tratamento. Todavia, pode haver combinações com outros antibióticos, como a tetraciclina, estreptomicina (Solera et al., 1996; Brasil, 2006; Godfroid et al., 2011). Porém, caso a infecção tenha ocorrido com a vacina RB51, não é recomendado o uso da rifampicina, pois esta cepa é resistente a este antibiótico (Brasil, 2006).

Patogênese e fatores de virulência da *Brucella* spp.

Bactérias do gênero *Brucella*, causam uma doença sistêmica, com localização do patógeno preferencialmente no fígado, baço e linfonodos, onde sobrevivem e se multiplicam em macrófagos, persistindo e provocando doença de curso crônico (Hong et al., 2000; Byndloss e Tsolis, 2015).

A cronicidade da infecção por *B. abortus* depende de sua capacidade de sobreviver e de multiplicar em células fagocíticas e não fagocíticas (Gorvel e Moreno, 2002). Além disso, sua capacidade de subverter o sistema imunológico do hospedeiro é fundamental para que a infecção inicial seja insidiosa, favorecendo o curso crônico da doença (Byndloss e Tsolis, 2015; Byndloss e Tsolis, 2016).

Após invadir o hospedeiro, *B. abortus* é fagocitada e passa a interagir com os endossomos precoces e tardios, adquirindo marcadores, como o Rab5 (Rabaptin-5), EEA-1 (Antígeno endossômico inicial 1) e o receptor da transferrina, resultando na formação do vacúolo contendo *Brucella* (VCB) (Pizarro-Cerdá et al., 2000; Celli et al., 2003; Fugier et al., 2007). O VCB interage com o lisossomo, resultando em um ambiente acidificado, indicado pelo marcador lisossomal LAMP-1 (Proteína de membrana associada ao lisossoma 1) (Pizarro-Cerdá et al., 1998). O ambiente acidificado constitui um sinal para a atuação do operon *virB*, que codifica o sistema de secreção tipo IV e a liberação de efetores no citosol das células hospedeiras (Boschioli et al., 2002). Após evitar a fusão com lisossomo, VCB deixa de expressar LAMP-1 e passa a expressar marcadores do retículo endoplasmático rugoso (RER), como calnexina, calreticulina, sec61 β (Proteína de transporte de proteína Sec61 subunidade beta) e PDI (Isomerase de dissulfeto de proteína), que permitem a multiplicação de *Brucella* nos seus sítios de replicação (Celli et al., 2003; Starr et al., 2008; Byndloss e Tsolis, 2016).

A patogenicidade da bactéria pode ser definida como a capacidade de infectar um hospedeiro, evadir das respostas do sistema imunológico, se multiplicar e causar lesão, sendo os fatores de virulência expressos por cada bactéria, fundamentais para sua patogenicidade (Gorvel e Moreno, 2002; Rolán et al., 2009; Jong et al., 2010). Diferentemente de outras bactérias patogênicas, *Brucella* sp. não possui fatores clássicos de virulência, como cápsulas, fimbrias e flagelos (Gorvel e Moreno, 2002). No entanto, alguns fatores de virulência são determinantes para a invasão e sobrevivência de *Brucella*, como sistema de secreção tipo IV (SST4), o lipopolissacarídeo (LPS), Beta 1,2 glucano cíclicos (C β G), o sistema regulador de dois componentes (BvrS/BvrR), dentre outros (Gorvel e Moreno, 2002; López-Goñi et al., 2002; Lapaque et al., 2005; Paixão et al., 2009).

O LPS das espécies de *Brucella* atuam como fator de virulência devido principalmente à baixa endotoxicidade e baixa estimulação do sistema imunológico inato, além de participar da formação do VCB (Martinez de Tejada et al., 1995; Lapaque et al., 2005). O LPS é fundamental para a integridade e estrutura da membrana externa das bactérias Gram-negativas (Cardoso et al., 2006). A constituição do LPS envolve ligação da cadeia O de polissacarídeo com um oligossacarídeo central ligado ao lipídeo A (Lapaque et al., 2005). O gênero *Brucella* possui dois fenótipos de LPS, sendo o fenótipo liso caracterizado pela presença da cadeia O do lipopolissacarídeo e o rugoso caracterizado pela ausência da cadeia O (Ko e Splitter, 2003). A baixa endotoxicidade do LPS liso e a sua capacidade de atrasar a maturação do VCB através da interação com as plataformas lipídicas, contribuem para inibir a fusão do VCB com o lisossomo (Ko e Splitter, 2003). Ao contrário, cepas mutantes rugosas não conseguem inibir a fusão com lisossomos e são degradadas (Ko e Splitter, 2003; Lapaque et al., 2005).

O Beta 1,2 glucano cíclico pertence a uma família de polímeros cíclicos de D-glicose ligadas por ligações β -1,2, sintetizadas por uma enzima presente na membrana denominada Cgs (Roset et al., 2014). Esses glucanos interferem com a maturação do VCB ao interagir com as plataformas lipídicas presentes na membrana celular e evitando a fusão com o lisossomo (Arellano-Reynoso et al., 2005; Roset et al., 2014).

O sistema regulatório de dois componentes BvrS/BvrR, formado pela junção de duas proteínas, uma regulatória (BvrR) e outra sensorial (BvrS), também são importantes no mecanismo de invasão e sobrevivência de *Brucella* (López-Gõni et al., 2002). Este sistema está envolvido com a expressão e integridade das proteínas de membrana externa (López-Gõni et al., 2002). As mutantes BvrS/BvrR não conseguem inibir a fusão do VCB com lisossomo (Fugier et al., 2007).

Outro importante fator de virulência relacionado com a sobrevivência intracelular de *Brucella* sp. é o SST4, codificado pelo operon *virB* (O'Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000). Este operon é constituído por 12 genes (*virB1* a *virB12*), sendo 11 considerados conservados em outras bactérias patogênicas como *Legionella pneumophila* e *Bordetella pertussis*, enquanto que o gene *virB12* só foi identificado em bactérias do gênero *Brucella* (O'Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000). O SST4 é um sistema caracterizado por um complexo proteico responsável pelo transporte de proteínas efetoras para o citoplasma das células alvo (O'Callaghan et al., 1999; Boschioli et al., 2002; Waksman e Orlova, 2014). A estrutura do complexo se baseia em três grupos funcionais, sendo o pilus da superfície bacteriana formado por VirB2 e VirB5, o canal proteico transmembrana formado por VirB3, VirB7-10 e a região da membrana citoplasmática formada por VirB4 e VirB11 (Waksman e

Orlova, 2014).

O SST4 é essencial para a persistência da infecção por *B. abortus*, por conseguir modular a maturação do VCB e mediar a sobrevivência intracelular da bactéria. Na fase inicial, as bactérias com SST4 funcional impedem a fusão do VCB com o lisossomo e na fase tardia, permitem a interação entre o VCB e o RER favorecendo sua multiplicação intracelular, como demonstrando na Figura 1A (Ko e Splitter, 2003). Cepas mutantes com SST4 afuncional não excluem os marcadores lisossomais do VCB, permanecendo no ambiente acidificado e ocasionando na degradação de *Brucella* por mecanismos microbicidas do fagolisossomo, esquematizado na Figura 1B (Celli et al., 2003).

Em estudos *in vitro*, infecção de células fagocíticas e não fagocíticas com cepas de *B. abortus* mutantes para genes do operon *virB* têm redução na recuperação bacteriana a partir de 24 horas após inoculação, demonstrando que o SST4 é essencial para o crescimento intracelular de *Brucella* (Pizarro-Cerdá et al., 2000; Comerci et al., 2001; den Hartigh et al., 2004; den Hartigh et al., 2008). Em estudos *in vivo*, cepas mutantes *virB* conseguem colonizar baço e fígado de camundongos nos primeiros dias (Jong et al., 2010), porém, há redução da colonização bacteriana em relação a cepa selvagem a partir do quinto dia após a inoculação, sugerindo que SST4 não é necessário para colonização e disseminação, mas sim para persistência inicial da infecção em modelo murino (Rolán e Tsohis, 2007; Paixão et al., 2009; Jong et al., 2010).

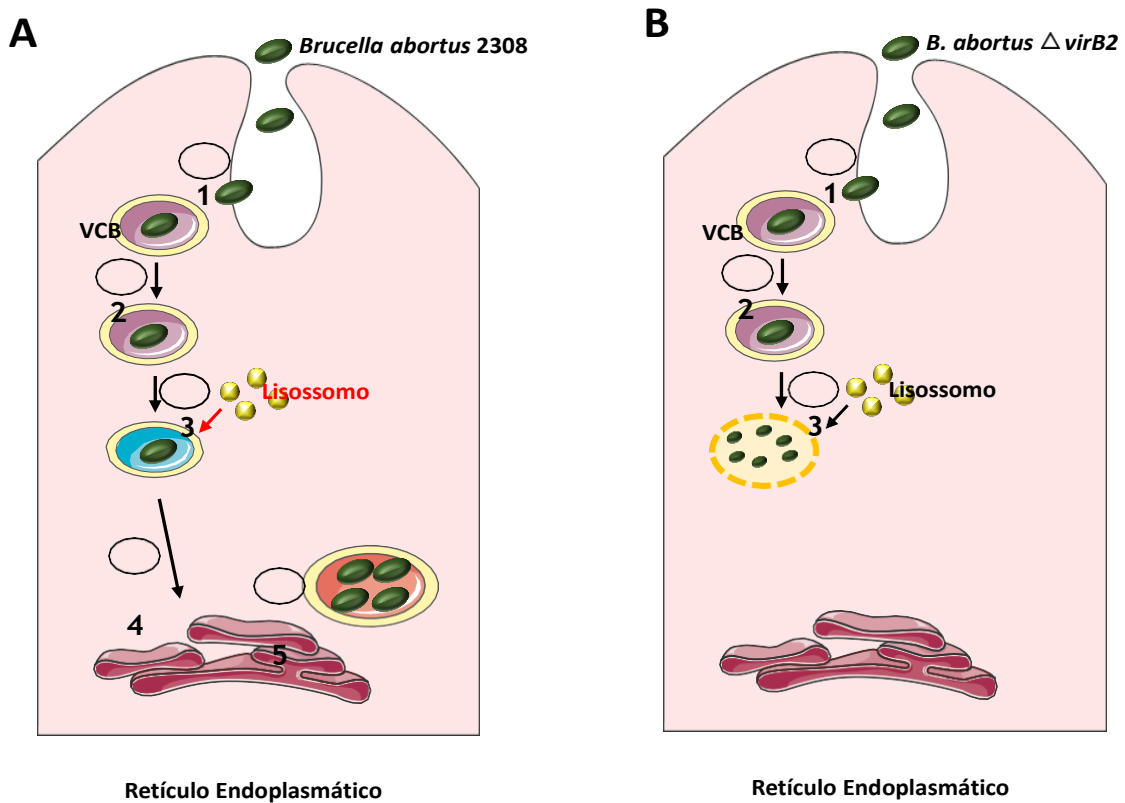


Figura 1: Tráfego intracelular de *Brucella* sp. *Brucella* sp. é capaz de sobreviver e multiplicar no citoplasma da célula do hospedeiro, ao evitar a fusão do vacúolo contendo *Brucella* (VCB) com o lisossomo e direcionando para sítio de multiplicação. **A)** (1) *Brucella abortus* é fagocitada pelo macrófago, (2) formação do vacúolo contendo *Brucella* (VCB) com marcadores endossomais, (3) a acidificação do VCB, ativa o operon *virB* e a expressão do SST4 inibe sua fusão com o lisossomo, (4) o VCB adquire marcadores de retículo endoplasmático, (5) e ocorre a multiplicação de *Brucella*. **B)** (1) A cepa mutante $\Delta virB2$ é fagocitada por macrófagos, (2) ocorre a formação do VCB com marcadores endossomais, (3) VCB interage com o lisossomo degradando a cepa mutante $\Delta virB2$.

Adaptado de: Ke et al., 2015

As lesões histopatológicas ocasionadas pela infecção por *Brucella* sp. são caracterizadas por infiltrado neutrofílico na fase aguda da infecção, seguido por infiltrado histiocitário e microgranulomas na fase crônica (Enright et al., 1990; Silva et al., 2011). A resposta inflamatória durante a infecção, ocasiona na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama ($IFN-\gamma$) afim de destruir a bactéria (Pasquali et al., 2001; Roux et al., 2007). O SST4 de *Brucella* é necessário para induzir a expressão de mediadores inflamatórios relacionados a resposta mediadas por $IFN-\gamma$ (Roux et al., 2007; Rolán et al., 2009; Jong et al., 2010), que auxilia na resposta imune tipo T helper 1 (Th1), resposta considerada protetora contra bactérias intracelulares como *Brucella* sp. (Rolán e Tsolis, 2007; Rolán e Tsolis, 2008; Jong et al., 2010).

Resposta imunológica inata induzida por *Brucella* spp.

A resposta imunológica inata é caracterizada por uma resposta não específica e é considerada a primeira linha de defesa do organismo (Gomes et al., 2012). Durante a infecção, a detecção rápida dos patógenos invasores é essencial para que o hospedeiro induza uma resposta inflamatória para controlar a doença. A resposta imunológica inata desempenha papel importante contra a infecção por *B. abortus*, todavia, essa bactéria possui a capacidade de subverter a resposta imunológica inata (Jong et al., 2010; Byndloss e Tsolis, 2015; Byndloss e Tsolis, 2016). Macrófagos, células dendríticas e trofoblastos são as células alvo durante a infecção por *Brucella*, e a resposta inicial desencadeada por estas células no início da infecção influencia no curso da doença (Celli et al., 2003; Carvalho Neta et al., 2008; Salcedo et al., 2008; Byndloss e Tsolis, 2016).

O reconhecimento de patógenos é mediado por receptores celulares, como os receptores semelhantes a *toll* (TLR - *Toll-like receptor*), presentes em células do sistema imunológico como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas e também em células epiteliais e fibroblastos (Moresco et al., 2011). Esses receptores reconhecem moléculas presentes em patógenos denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ (Moresco et al., 2011; Gomes et al., 2012). Estas citocinas pró-inflamatórias iniciarão os mecanismos de defesa do hospedeiro associado a inflamação (Jong et al., 2010; Salcedo et al., 2013; Hielpos et al., 2017).

Os receptores TLR possuem uma porção extracelular, responsável pelo reconhecimento do patógeno e uma porção intracitoplasmática composta por um domínio TIR (Toll-interleucina receptor 1) cuja função é dar início a cascata intracelular de sinalização, mediado pela interação com moléculas adaptadoras como a resposta primária de diferenciação mieloide (MyD88), receptor contendo domínio toll-interleucina 1 (TIRAP) também chamado de MAL, o interferon indutor de adaptador contendo um domínio TIR (TRIF) e o molécula de adaptador relacionada ao adaptador TRIF (TRAM) (Moresco et al., 2011). A interação do TLR com as moléculas adaptadoras resulta no recrutamento de proteínas da família da quinase, como a quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) e o receptor de TNF associado à ubiquitina ligase (TRAF6) que se ligam a quinase 1 associada a TGF-beta (TAK1), fosforilam e ativam o complexo quinase I κ B (IKK) e as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), resultando na ativação do fator de transcrição NF- κ B e proteína ativadora-1 (AP-1) que são essenciais para a indução da resposta imunológica e para a produção de citocinas pró-inflamatórias (Aderem e Ulevitch, 2000; Sorrentino et al., 2008; Moresco et al., 2011;

Gomes et al., 2012).

A via de sinalização do NF- κ B pode ser dependente ou independente do MyD88, visto que a sinalização MyD88-dependente é compartilhada por todos TLR, exceto o TLR3 (Moresco et al., 2011). Na via independente, o sinal do TLR ativa o NF- κ B através das moléculas adaptadoras TRIF e TRAM, ou através da associação do MyD88 com uma proteína adaptadora, como o TIRAP (Aderem e Ulevitch, 2000; Sorrentino et al., 2008). O MyD88 é considerado crucial para a ativação do fator de transcrição NF- κ B e a indução de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α , ao iniciar a cascata que promove a ativação de MAP quinases e translocação do NF- κ B para controlar a expressão dessas citocinas (Weiss et al., 2005; Macedo et al., 2008; Gomes et al., 2012).

O TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9 são os principais receptores TLR responsáveis por desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a infecção *in vitro* e *in vivo* por *Brucella* (Huang et al., 2003; Campos et al., 2004; Huang et al., 2005; Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007, Macedo et al., 2008; Salcedo et al., 2008; Almeida et al., 2013; Gomes et al., 2016). O LPS e lipoproteínas são reconhecidos por TLR4 e TLR2/6, respectivamente expressos na membrana plasmática da célula hospedeira. O TLR9 reconhece o CpG-DNA bacteriano e tem sua expressão restrita ao compartimento endossomal do citoplasma (Moresco et al., 2011). Como *Brucella* sp. não possui flagelo funcional como outras bactérias, o TLR5 não é ativado na infecção. O papel do TLR4 é considerado controverso, podendo ou não ser considerado importante no controle da infecção por *Brucella* (Campos et al., 2004; Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007; Copin et al., 2007). O TLR6, mas não o TLR2, parece ser importante no controle inicial da infecção em modelo murino (Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007; Almeida et al., 2013). Diversos estudos demonstram maior susceptibilidade de camundongos TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} à infecção por *Brucella* sp., caracterizada por maior recuperação bacteriana no baço desses animais, além de menor ativação do sistema imunológico inato. Desta forma, o receptor TLR9 e a molécula adaptadora MyD88 desempenham função importante no reconhecimento e desenvolvimento de resposta efetora importante no controle da infecção por *Brucella* sp. em camundongos (Huang et al., 2005; Weiss et al., 2005; Macedo et al., 2008; Almeida et al., 2013; Gomes et al., 2016; Lacey et al., 2017).

Brucella sp. consegue interferir na via de sinalização TLR favorecendo uma resposta insidiosa e o estabelecimento da infecção crônica (Cirl et al., 2008, Salcedo et al., 2008; Salcedo et al., 2013). A proteína de *Brucella*, BtpA, descrita previamente como Btp1 ou TcpB (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008), possui um domínio semelhante ao domínio TIR (Cirl et al., 2008;

Salcedo et al., 2008) e é capaz de inibir a via de sinalização do TLR2, TLR4 e TLR9 ao se ligar na proteína adaptadora (TIRAP), impedindo a ligação do MyD88 e consequentemente inibindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Figura 2) (Salcedo et al., 2008).

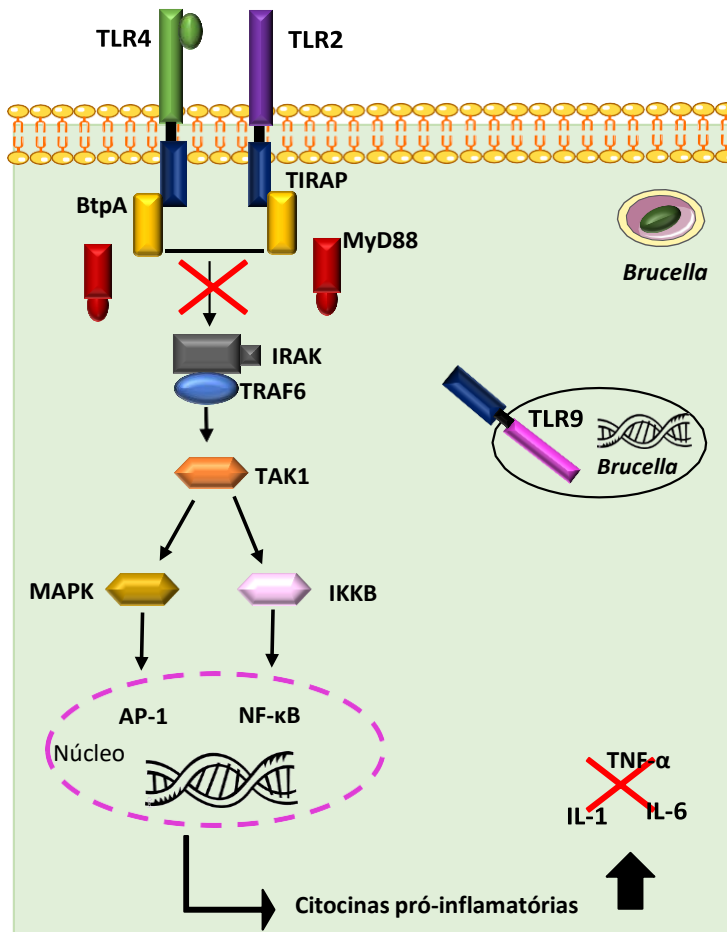


Figura 2: Modelo para subversão da imunidade inata por BtpA de *Brucella abortus*. BtpA é liberada no citosol do hospedeiro, inibe a sinalização do TLR2, TLR4 e TLR9 ao se ligar na proteína adaptadora (TIRAP), impedindo a ligação do MyD88, bloqueando a transcrição dos fatores de transcrição nuclear NF-κβ e AP-1 e consequentemente inibindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. **Adaptado de:** Gomes et al., 2012

Embora proteínas semelhantes ao TIR de *Brucella* possam prejudicar o reconhecimento da bactéria pelo sistema imunológico do hospedeiro via TLR, estudos *in vitro* e *in vivo* com cepas mutantes de *B. abortus* $\Delta btpA$ e $\Delta btpB$, demonstraram que estas proteínas não interferem na sobrevivência e replicação da bactéria (Radhakrishnan et al., 2009; Salcedo et al., 2013; Hielposet al., 2017; Mol et al., 2016).

Interessantemente, embora a dupla depleção de BtpA e BtpB em *B. abortus* também não afete a sobrevivência intracelular da bactéria *in vitro* e *in vivo* em camundongos imunocompetentes, favorece a sobrevivência de camundongos knockout IRF1^{-/-} infectados com cepas mutantes comparadas aos infectados com cepa selvagem virulenta, sugerindo que estas proteínas podem interferir tanto no desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora quanto deletéria no hospedeiro (Salcedo et al., 2013).

Modelo experimental de implante sintético (esponja)

Os camundongos são amplamente utilizados como modelo animal experimental para investigar patogênese, fatores de virulência e mecanismos da resposta imune da brucelose (Silva et al., 2011). Diversas linhagens de camundongos são utilizadas na infecção experimental por *Brucella* sp., sendo o camundongo da linhagem Balb/c considerado mais susceptível a infecção quando comparado ao C57/BL6 (Murphy et al., 2001a).

O implante de esponja de poliéter-poliuretano em animais de laboratório, tem permitido o estudo de inflamação crônica, angiogênese e fibroplasia (Campos et al., 2006; Marques et al., 2011; Socarrás et al., 2014). Essa matriz é implantada no tecido subcutâneo do animal, induz um influxo de neutrófilos e macrófagos seguida por angiogênese e fibroplasia com uma deposição de matriz extracelular, sendo possível analisar através de alterações histológicas a formação da inflamação crônica do tipo corpo estranho e de tecido de granulação (Andrade et al., 1997). Adicionalmente, a matriz sintética tem sido utilizada como suporte regenerativo para desenvolvimento de diversos outros tipos de tecidos como por exemplo o pâncreas, permitindo avaliação *ex vivo* do tecido regenerado em diferentes condições patológicas (Socarrás et al., 2014; Pereira et al., 2017; Lazari et al., 2018).

Utilizando o modelo de esponja, um estudo sobre a influência da herança genética entre camundongos Balb/c, C57/BL6 e Swiss na avaliação da inflamação, revelou diferenças entre as três linhagens de camundongos. O camundongo Balb/c apresenta resposta inflamatória neutrofílica mais intensa quando comparado com as outras linhagens, porém essa atividade é semelhante entre as linhagens com 14 dias pós implante. Na análise do recrutamento de macrófagos, não há diferença entre os grupos nos primeiros dias pós implante, todavia, os camundongos Swiss são capazes de recrutar mais macrófagos tardiamente quando comparados com as outras linhagens. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsável por estimular a formação de vasos sanguíneos é mais elevado nos camundongos Balb/c com 10 dias pós implante quando comparado com as outras linhagens, no entanto, a esponja do Swiss apresenta maior formação de vasos comparado com as outras duas linhagens. Um estudo,

demonstrou que os camundongos Balb/c formam menos vasos colaterais em relação aos camundongos C57/BL6 e que esses vasos são perdidos 3 semanas após o nascimento (Chalothorn et al., 2007). Dessa forma, é possível que essa característica vascular possa interferir na angiogênese presente na esponja (Marques et al., 2011).

Considerando a importância de avaliar os mecanismos inflamatórios que estão envolvidos no processo da infecção ocasionada pela brucelose, o modelo de implante de biomaterial torna-se uma ferramenta promissora. Embora esse implante de biomaterial seja um excelente modelo para estudo de inflamação (Laschke et al., 2005; Moraes et al., 2010), inclusive já tendo sido utilizado para avaliar inflamação em implantes com neoplasias (Viana et al., 2015), inflamação em diferentes condições metabólicas como diabetes ou obesidade ou modelos de doenças autoimunes (Campos et al., 2011; Lima et al., 2014; Socarrás et al., 2014; Pereira et al., 2017, Orellano et al., 2018), não há estudos que utilizam biomateriais sintéticos para avaliar inflamação *in vivo* causada por patógenos, em especial por *Brucella* sp.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo inflamatório agudo induzido pela infecção por *B. abortus* e a influência do SST4 e BtpA no processo utilizando-se o modelo de implante de matriz sintética em camundongos.

Objetivos específicos

- I- Caracterizar em esponjas de poliéster-poliuretano implantadas em camundongos Balb/C e em órgão sistêmico como baço, a recuperação bacteriana de *B. abortus*, *B. abortus* $\Delta btpA$ e *B. abortus* $\Delta virB2$.
- II- Caracterizar em esponjas de poliéster-poliuretano implantadas em camundongos Balb/C a inflamação aguda induzida pela infecção por *B. abortus*, *B. abortus* $\Delta btpA$ e *B. abortus* $\Delta virB2$ ou PBS, avaliando os tipos celulares inflamatórios e a formação de tecido fibrovascular.
- III- Caracterizar em esponjas de poliéster-poliuretano implantadas em camundongos Balb/C a localização da bactéria em células inflamatórias na fase aguda da inflamação.
- IV- Caracterizar em esponjas de poliéster-poliuretano implantadas em camundongos Balb/C, as citocinas e quimiocinas induzidas pela infecção por *B. abortus*, *B. abortus* $\Delta btpA$ e *B. abortus* $\Delta virB2$ ou PBS.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Total de 40 camundongos fêmeas BALB/c com idade de 6 a 8 semanas oriundos do biotério central (Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG) foram utilizados neste estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEUA-UFMG, protocolo 91/2018). Os camundongos foram aclimatados durante uma semana antes de cada experimento e acomodados em gaiolas individuais em raque ventilada com sistema de exaustão, recebendo ração e água *ad libitum* e mantido sob um ciclo claro/escuro de 12 horas, a 24°C em biotério de biossegurança nível 3.

O desenvolvimento da resposta inflamatória foi avaliado em quatro grupos experimentais com 7 e 14 dias após o implante da esponja sintética (dpie) e 6 e 13 dias após infecção por *Brucella abortus*. Os grupos experimentais avaliados foram: grupo B1: infectados com *Brucella abortus* 2308 (n=5); grupo B2: infectados com *B. abortus* $\Delta btpA$ (n= 5); grupo B3: *B. abortus* $\Delta virB2$ (n=5), grupo controle: inoculado com PBS (n=5). O delineamento experimental está sumarizado no esquema apresentado na Figura 3.

Implante da esponja sintética

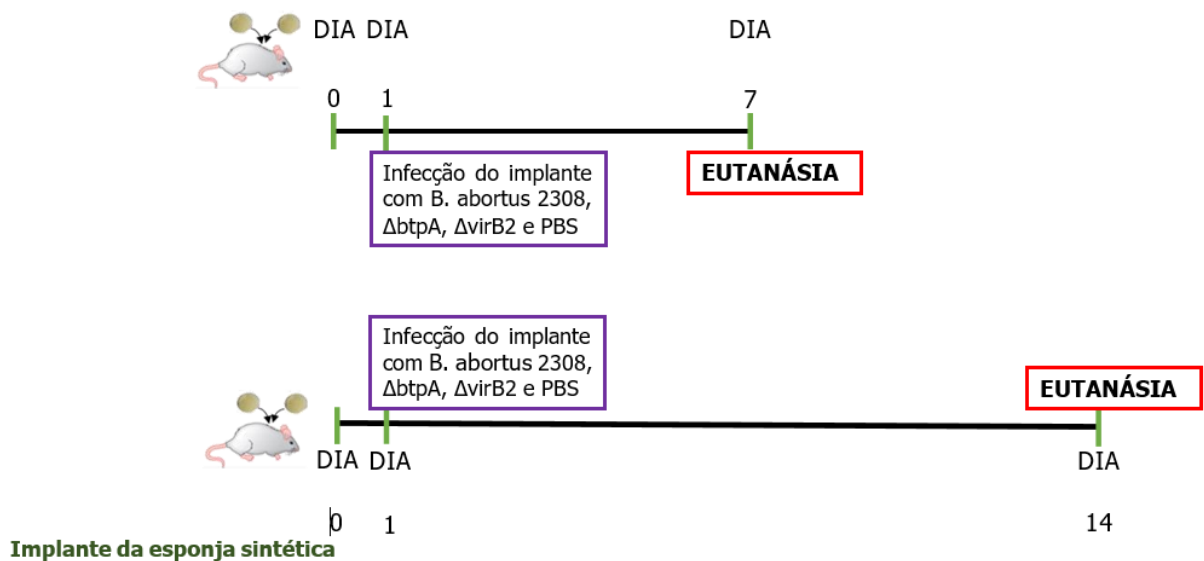


Figura 3: Delineamento experimental. No dia 0, foi realizado o implante de duas esponjas no tecido subcutâneo da região cervical dos camundongos. Vinte quatro horas pós implante, os camundongos foram inoculados diretamente na esponja com 50 μ l de PBS (controle) ou 50 μ l de 10⁴ UFC de *B. abortus* 2308, *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ em cada esponja. Nos dias sete (n=5) e 14 (n=5) pós inoculação foi realizada a eutanásia dos camundongos e esponja e baço foram coletados para análise bacteriológica, e esponja para análise histológica e bioquímica da resposta inflamatória.

Preparo e implantação dos discos de matriz sintética (esponja)

Discos de 0,8 cm de diâmetro e 5 mm de espessura foram obtidos de uma placa de poliéster- poliuretano (Vitafoam Ltda., Manchester, UK), utilizando um *punch* cirúrgico, gentilmente cedidos pela professora Monica Diniz Ferreira (UFMG). As esponjas foram colocadas em etanol 70% v/v por no mínimo de 24 horas e autoclavadas em água destilada. Para a implantação das esponjas, os camundongos foram anestesiados com solução de xilazina 2% e cetamina 10% (16 e 100 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal e submetidos à tricotomia e à assepsiada região cervical dorsal para alocação do implante sintético no espaço subcutâneo. Foi realizado uma incisão no dorso da região cervical e após delicada divulsão do tecido subcutâneo, foi depositado dois implantes de esponjas, seguido pela sutura cirúrgica (fio de sutura agulhado 4-0). Os animais foram mantidos em observação pós-cirúrgica e finalmente alojados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum* (Andrade et al., 1997).

Cultivo de *B. abortus* e infecção das esponjas por *Brucella abortus*

O inóculo foi preparado a partir da cepa virulenta *B. abortus* 2308 e das cepas mutantes *B. abortus* $\Delta btpA$ e *B. abortus* $\Delta virB2$ cultivadas em placa com meio sólido *Trypticase soy Agar* (TSA) (Becton-Dickson, USA) por quatro dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Colônias coletadas da placa foram ressuspensas em tampão fosfato salina (PBS) e a concentração por unidades formadoras de colônia (UFC) /mL determinada usando espectrofotômetro e comprimento de onda de 600nm (SmartSpec, BioRad). Para estimar a concentração final do inóculo foi considerado para *Brucella* o valor de densidade óptica 1 = 3x10⁹ UFC/mL. Vinte quatro horas após o implante, 50 µL do inóculo contendo 1x 10⁴ UFC de *B. abortus* 2308, *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ ou PBS foram inoculadas com seringa diretamente em cada esponja implantada na região cervical do camundongo. Diluições seriadas na base 10 das culturas bacterianas foram plaqueadas em meio TSA para confirmação do inóculo. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em biotério de segurança nível 3. As cepas mutantes utilizadas neste estudo foram previamente descritas (Tabela 1) (Sá et al., 2012; Vieira, 2012).

Tabela 1. Cepas mutantes utilizadas no trabalho.

<i>B. abortus</i> mutante	Localização da mutação	Plasmídeo	Resistente	Descrito por:
<i>B. abortus</i> $\Delta virB2$	Cromossomo II de <i>Brucella</i> spp	pAV2.2	Kanamicina	Sá et al., 2012
<i>B. abortus</i> $\Delta btpA$	Cromossomo 1 de <i>B. abortus</i> (BAB1_0279)	pBMEI1674	Kanamicina	Vieira, 2012

Extração dos implantes

Após 7 dpie ou 14 dpie, cinco camundongos por grupo foram submetidos a eutanásia com sobredose de anestésico (Solução de Xilazina 2%, 30 mg/Kg + Cetamina 10%, 300 mg/Kg), administrada por via intraperitoneal. Os implantes foram removidos, pesados e uma esponja destinada a análises histopatológicas e imunoistoquímica e a outra esponja destinada para contagem bacteriana e testes bioquímicos.

Contagem bacteriana

As esponjas foram maceradas em 2 mL de PBS estéril em tubo falcon de 50 mL, em seguida feita a diluição seriada na base 10 e 100 mL plaqueados em meio TSA (Becton-Dickson, USA). Após quatro dias de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂ as colônias foram contadas e UFC/g de esponja e baço foi determinado.

Avaliação microscópica das esponjas

Para avaliar as alterações microscópicas do processo inflamatório, os implantes (um implante por animal) foram processados por inclusão em parafina e cortes seriados de 4 µm corados por hematoxilina-eosina (HE). Todas as alterações histopatológicas foram descritas, além do tipo e intensidade do infiltrado inflamatório, bem como a formação tecido fibrovascular, sendo 0= ausente, 1= discreto, 2= moderado ou 3= intenso.

Imunoistoquímica

Os cortes histológicos em lâminas foram desparafinizadas com imersão em xilol por 15 minutos por 2 vezes, reidratadas em banhos de 3 minutos em etanol com diluições decrescentes (100, 100, 90 e 80%) e realizado 3 lavagens com PBS por 5 minutos. A recuperação do antígeno foi realizada em banho-maria a 95°C por 20 minutos com solução de citrato/fosfato pH 6,0 para imunoistoquímica para marcação de neutrófilos. Após desparafinizar e reidratar, as lâminas

foram imersas em solução bloqueadora de peroxidase endógena por meio do peróxido de hidrogênio 3% e bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó (Molico, Nestlé®) 6%, por uma 1 hora cada passo. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com seus respectivos anticorpos primários. A Tabela 2, lista os clones, diluições, recuperação antigênica e anticorpos secundários utilizados. A imunomarcação foi relevada com cromógeno 3'3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+Substrate Chromogen system*; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA) por 25 segundos para *Brucella* sp. e 1 minuto para a marcação dos neutrófilos, e as lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer por quatro segundos. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

Tabela 2: Características dos anticorpos para a imunistoquímica

Identificação do anticorpo 1°	Clone	Produzido em	Diluição	Anticorpo secundário	Empresa
<i>Brucella</i> sp.	Policlonal	Coelho	1:1000	EnVision™ FLEX+ system – Dako	In-house Santos et al., 1998
NIMP-R14: sc-59338 (Neutrófilo)	Monoclonal	Rato- IgG	1:100	IgG anti rato biotinizada (1:50) + estreptavidina conjugada com peroxidase (Dako)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Análise morfométrica

Fotomicrografia com aumento de 25X foi obtida de 1 esponja de cada animal dos diferentes grupos nos diferentes tempos para análise morfométrica usando microscópio BX40 (Olympus Company, Shinjuku, Tokio, Japão). Com o qual, toda a área da esponja foi delimitada e posteriormente, realizada a demarcação somente da área com formação de fibrovascular e o resultado da diferença foi expresso em porcentagem da área total da esponja ocupada por tecido fibrovascular.

Análise bioquímica da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade de neutrófilos e macrófagos foram avaliadas nas esponjas de forma indireta pela mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) e níveis de acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente. Após maceração de 1 implante em 2 mL de PBS, 1,5 mL do macerado foi centrifugado 500 µL do sobrenadante foi separado para ELISA e 250 µL do sedimento foi

homogeneizado com 750 μ L de tampão fosfato de sódio 80 mM, pH 6,0 para análise de MPO e mais 250 μ L do sedimento homogeneizado com 750 μ L de solução salina-Triton X-100 para análise de NAG.

A atividade de MPO das amostras de sedimento foi avaliada quantificando a absorvância (densidade óptica, OD) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM). A reação foi terminada adicionando 50 mL de H₂SO₄ (4 M), conforme Socarrás et al., (2014).

A atividade de NAG das amostras do sedimento foi avaliada mensurando a absorvância (OD) utilizando p-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosamina, conforme Socarrás et al., (2014). Os resultados foram expressos como OD/g de esponja.

Mensuração por ELISA de citocinas e quimiocinas dos implantes de esponja

Os implantes foram homogeneizados em 2 mL de PBS pH 7,4 e centrifugados a 10000 x g durante 10 minutos e 500 μ L de sobrenadante estocado a -20°C. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento transformante beta (TGF- β 1), quimiocina derivada de queratinócito (KC), ligante de quimiocina C-C Motif 2 (CCL2), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10), foram mensurados em 50 μ L do sobrenadante usando Kits de Imunoensaio (ReD Systems, EUA) e seguindo o protocolo do fabricante. Foi adicionado nas placas 50 μ L de anticorpo de captura em cada poço, a placa foi vedada e acondicionada em caixa escura e úmida a 4°C e incubada overnight. A seguir, foi realizada a lavagem das placas com tampão de lavagem e posteriormente adicionado 150 μ L de tampão de bloqueio por poço, então a placa foi vedada novamente e incubada à temperatura ambiente por 1 hora. As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 1200 g por 10 minutos, posteriormente 100 μ L do branco, dos padrões e das amostras foram adicionadas as placas e incubadas a 4°C overnight. No dia seguinte, após a remoção do conteúdo da placa pelo tampão de lavagem, foi adicionado 50 μ L o anticorpo de detecção biotilado em cada poço. Em seguida, foi adicionado o conjugado estreptavidina – HRP por 20 minutos, realizada a lavagem com tampão de lavagem e adicionado o substrato – OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride). A reação foi interrompida com a solução de paralização (H₂SO₄ 1M) e a intensidade da cor foi medida a 450 nm no espectrofotômetro (E max - Molecular Devices). Os resultados foram expressos como pg de citocina / mg de esponja.

Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6. Foi usado análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey para comparar o valor de unidades formadoras de colônia (UFC), peso (g) das esponjas, análise bioquímica e níveis de citocinas. O teste de não paramétrico Kruskal-Wallis foi usado comparar os escores histopatológicos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Recuperação bacteriana no baço e esponja dos camundongos infectados

Houve recuperação bacteriana no baço de camundongos infectados com *B. abortus* 2308, demonstrando que após a inoculação bacteriana na esponja implantada no espaço subcutâneo, *B. abortus* consegue disseminar e estabelecer infecção sistêmica (Figura 4A e B). A recuperação bacteriana no baço 7 dpie e 14 dpie foi semelhante entre 2308 e $\Delta btpA$, mas não houve recuperação bacteriana do baço de camundongos infectados com $\Delta virB2$ (Figura 4A e B). A colonização bacteriana na esponja foi detectada nos três grupos sendo maior nos camundongos infectados com 2308 e $\Delta btpA$ quando comparados com $\Delta virB$ ($p < 0,05$) (Figura 4C e D). Houve aumento de 2 logs de UFC nos grupos 2308 e $\Delta btpA$ indicando que a bactéria multiplicou no tecido da esponja. É possível observar maior imunomarcagem de *B. abortus* nos grupos 2308 e $\Delta btpA$ em relação ao grupo $\Delta virB2$ (Figura 4E).

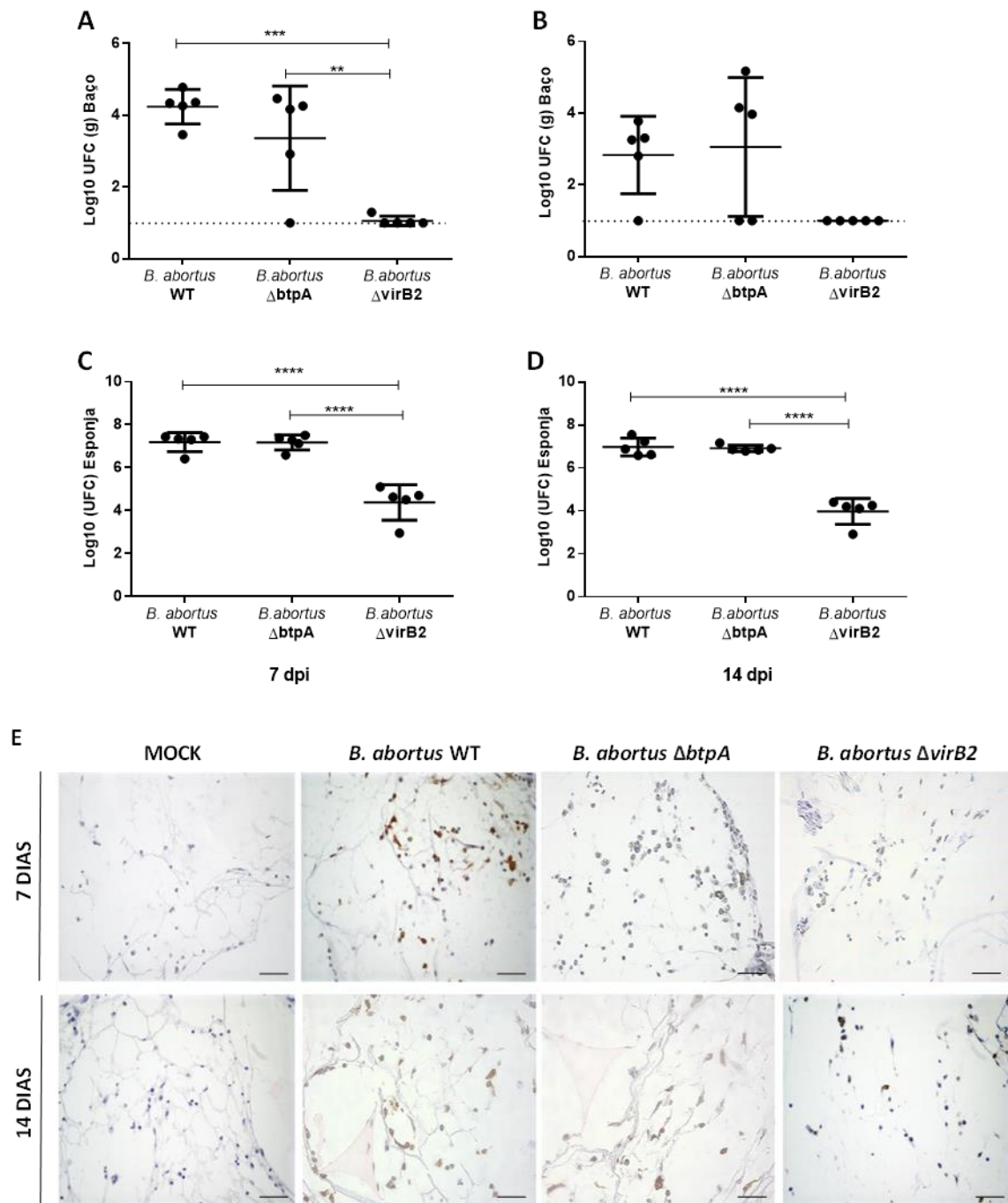


Figura 4: Recuperação bacteriana no baço e esponja. Os camundongos foram infectados com 10^4 UFC/esponja de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* Δ btpA, *B. abortus* Δ virB2 ou PBS (MOCK) (controle) (n=5) após 24 horas do implante o UFC foi determinado no baço (A-B) e esponja (C-D) nos tempos de sete (A-C) e 14 (B-D) dias após implante da esponja. Linha tracejada representa limite de detecção do teste. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. A imunomarcagem de *B. abortus* (E) nas esponjas mostrou maior quantidade de bactéria nos grupos *B. abortus* 2308 e *B. abortus* Δ btpA com localização predominantemente intracelular, aumento 40X. Os resultados foram analisados utilizando o teste de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Pontos representam os camundongos e as barras a média/SD.

Mensuração de citocinas inflamatórias

Ao analisar IFN- γ e IL-10 do sobrenadante das esponjas, não foi observado diferença estatística entre os grupos com 7 dpi (Figura 5A e C). Aos 14 dpi, os grupos *B. abortus* 2308 e $\Delta btpA$ apresentaram maior produção de IFN- γ comparado com os grupos $\Delta virB2$ e PBS (Figura 5B). Maior produção de IL-10 foi observada no grupo PBS e menor produção de IL10 foi observada no grupo $\Delta btpA$ quando comparado com o grupo *B. abortus* (Figura 5D).

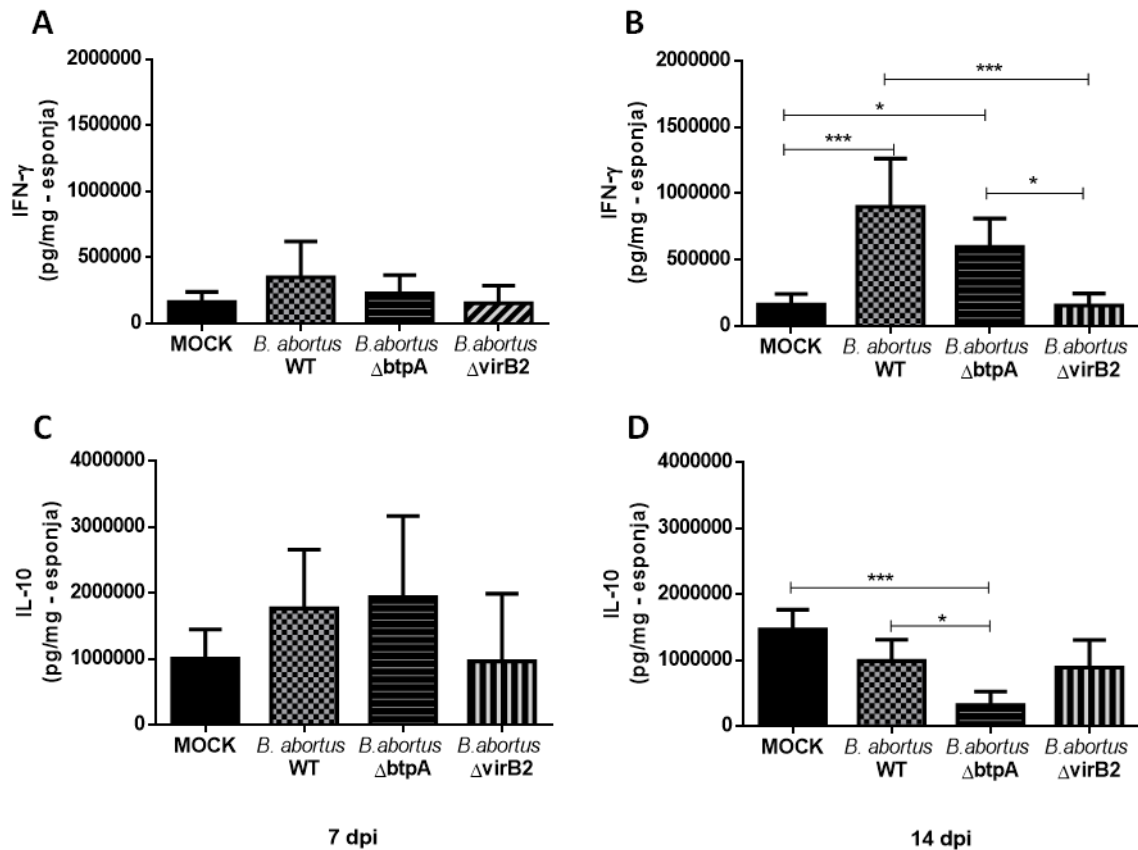


Figura 5: Análise de citocina pró e anti-inflamatória. Esponjas implantadas em camundongos ($n = 5$) foram infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle. Sete e 14 dias pós implante, os camundongos foram eutanasiados e a esponja colhida para análise da secreção de IFN- γ (A e B) e IL-10 (C e D) medida por ELISA. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

Na análise do TNF- α que é uma citocina pró-inflamatória induzida na fase aguda da inflamação, não foi observado diferença estatisticamente significativa na concentração de TNF- α entre os grupos com 7 dpi e 14 dpi (Figura 6A e B). Ao analisar o TGF- β 1 que é uma proteína responsável por controlar a proliferação, diferenciação e imunidade celular, relacionada com a inflamação crônica, não foi observada diferença significativa entre os grupos aos 7 dpi (Figura 6C), mas com 14 dpi (Figura 6D), os grupos PBS e $\Delta virB2$ apresentaram maior proliferação celular quando comparado com os grupos *B. abortus* 2308 e $\Delta btpA$, indicando que *B. abortus* interfere no processo de proliferação tecidual na esponja.

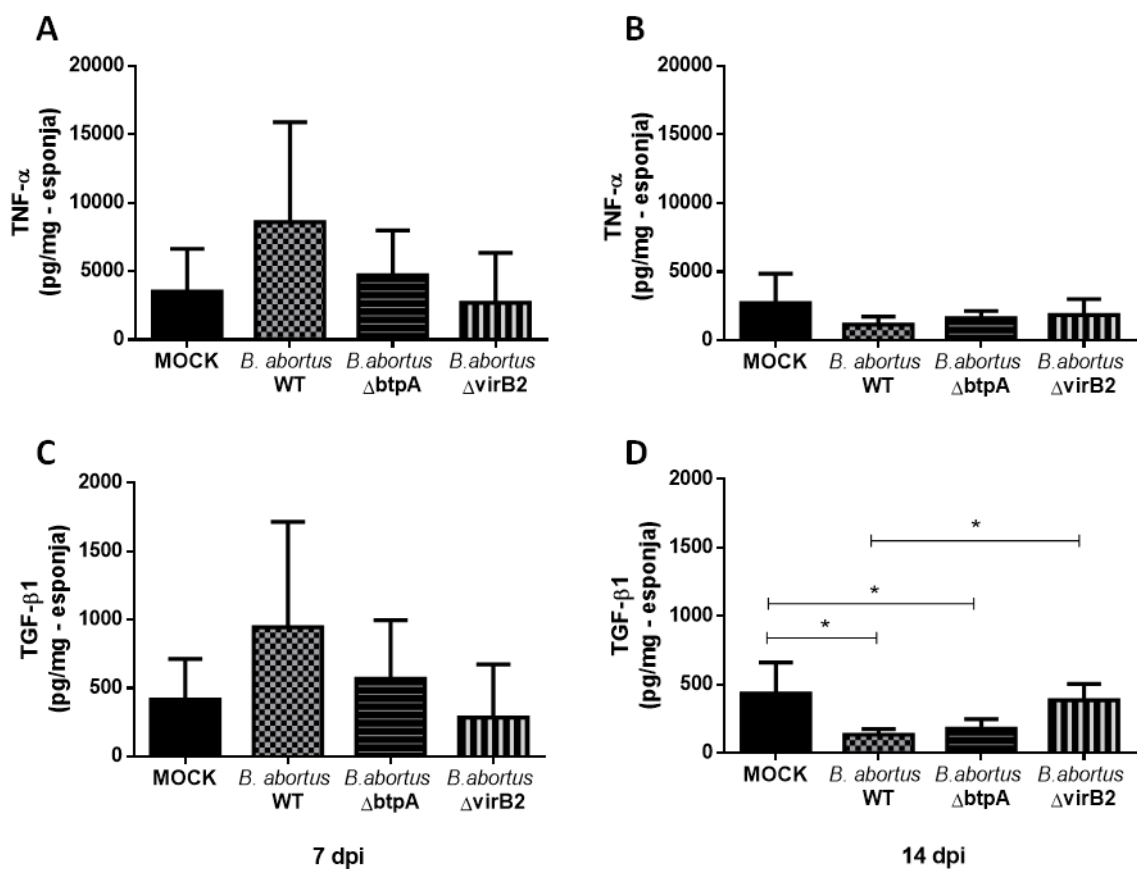


Figura 6: Níveis de citocinas em implantes de esponja. Esponjas implantadas em camundongos (n=5) foram infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle. Sete e 14 dias pós implante, os camundongos foram eutanasiados e a esponja colhida para análise da secreção de (A - B) TNF- α , (C- D) TGF- β 1. Foi considerado diferença significativa, quando o $*P < 0.05$. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Avaliação microscópica do processo inflamatório na esponja

Na avaliação histopatológica das esponjas não houve diferença na quantidade de infiltrado inflamatório no centro da esponja entre os grupos aos 7 dpie. Contudo, aos 14 dpie esponjas dos grupos *B. abortus* $\Delta virB2$ e controle negativo estavam mais celularizadas (Figura 7A), com maior infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, macrófagos, células gigantes multinucleadas e raros mastócitos. Ao analisar a formação do tecido fibrovascular, fenômeno mais tardio do processo, ocorreu maior formação nas esponjas dos grupos *B. abortus* $\Delta virB2$ e controle em comparação com os grupos *B. abortus* 2308 e $\Delta btpA$ principalmente aos 14 dpie (Figura 7B). Na análise de escore de inflamação (Figura 7C-D) e na análise de tecido de granulação (Figura 7E-F) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Adicionalmente, a formação de tecido fibrovascular na esponja foi determinada pela porcentagem da área da esponja ocupada por capsula e tecido inflamatório associada a tecido conjuntivo jovem vascularizado em relação a área total da esponja. Aos 7 dpie, formação fibrovascular foi semelhante entre os grupos (Figura 8A). No entanto, aos 14 dpie, os grupos $\Delta virB2$ e controle apresentaram maior formação de tecido fibrovascular na esponja quando comparados com os grupos *B. abortus* 2308 e $\Delta btpA$ (Figura 8B).

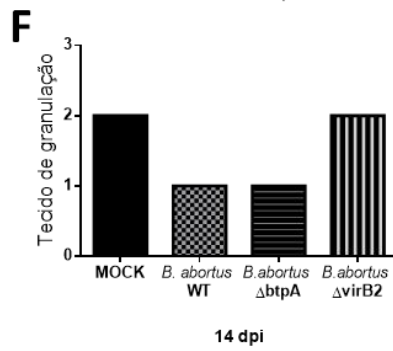
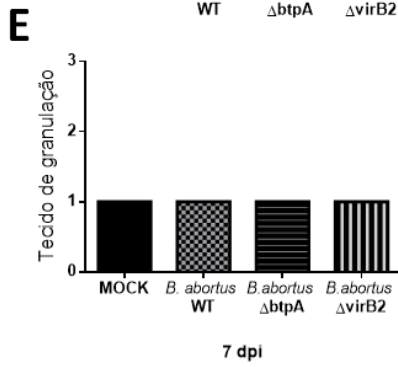
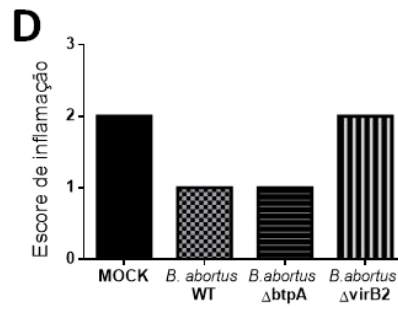
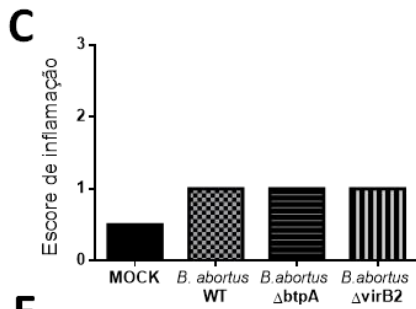
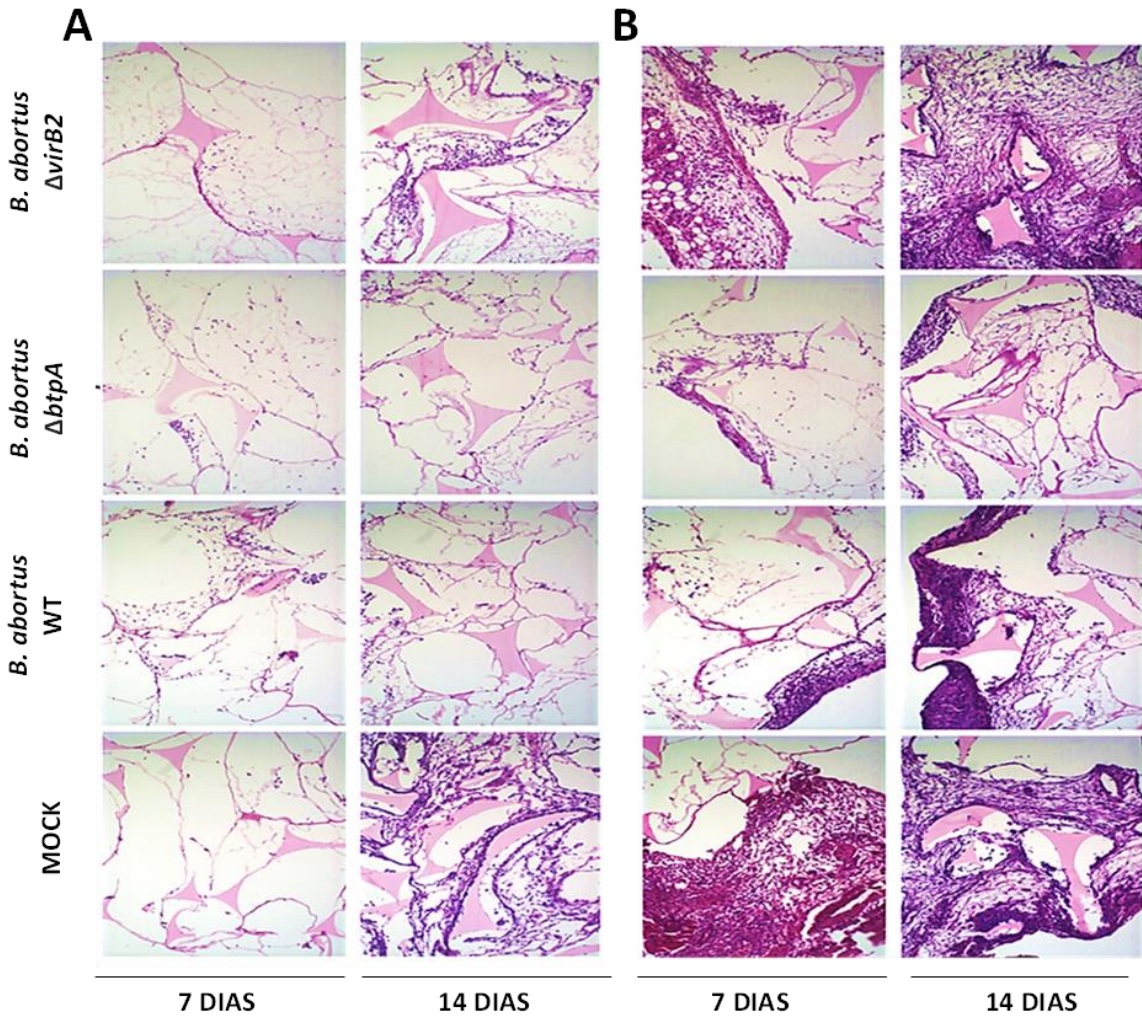


Figura 7: Aspectos microscópicos da esponja. Esponjas infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle, foram colhidas para análise histopatológica. Imagens representativas do centro da esponja (A) e do tecido fibrovascular periférico (B) com 7 e 14 dpi (H&E, aumento de 20x), mostrando aumento de celularidade no centro da esponja dos diferentes grupos. Análise de escore de inflamação (C e D) e tecido de granulação (E e F) dos quatro grupos com 7 e 14 dpi.

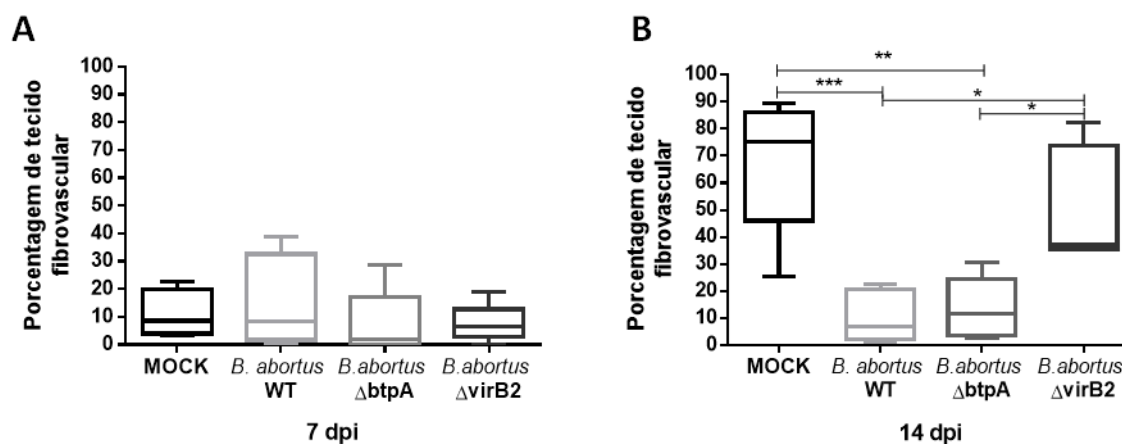


Figura 8: Formação de tecido fibrovascular na esponja. Esponjas implantadas em camundongos ($n=5$) e infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle, foram colhidas com 7 (A) e 14 dpi (B) para mensuração morfométrica da área da esponja ocupada por capsula e tecido inflamatório associada a tecido conjuntivo jovem vascularizado. * $P < 0.05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Os resultados foram analisados utilizando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey

Quantificação de neutrófilos

A dosagem de MPO possibilita quantificar de forma indireta a atividade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação (Pereira et al., 2012; Socarrás et al., 2014). Não houve diferença significativa estatística na análise de MPO nos grupos avaliados nos diferentes tempos (Figura 9A e B) e na análise de KC nos grupos com 7 dpi. Contudo, aos 14 dpi, houve maior concentração de KC nas esponjas infectadas *B. abortus* $\Delta virB2$, quando comparada a 2308 e $\Delta btpA$ ($p < 0,05$) (Figura 9C e D). Ao analisar a imunoistoquímica para neutrófilos, observamos maior marcação nos grupos aos 14 dpi comparado aos 7 dpi (Figura 9E). A contagem de neutrófilos por campo demonstrou menor quantidade nos grupos *B. abortus* 2308 e $\Delta btpA$ quando comparado com $\Delta virB2$ e PBS (Figura 9F).

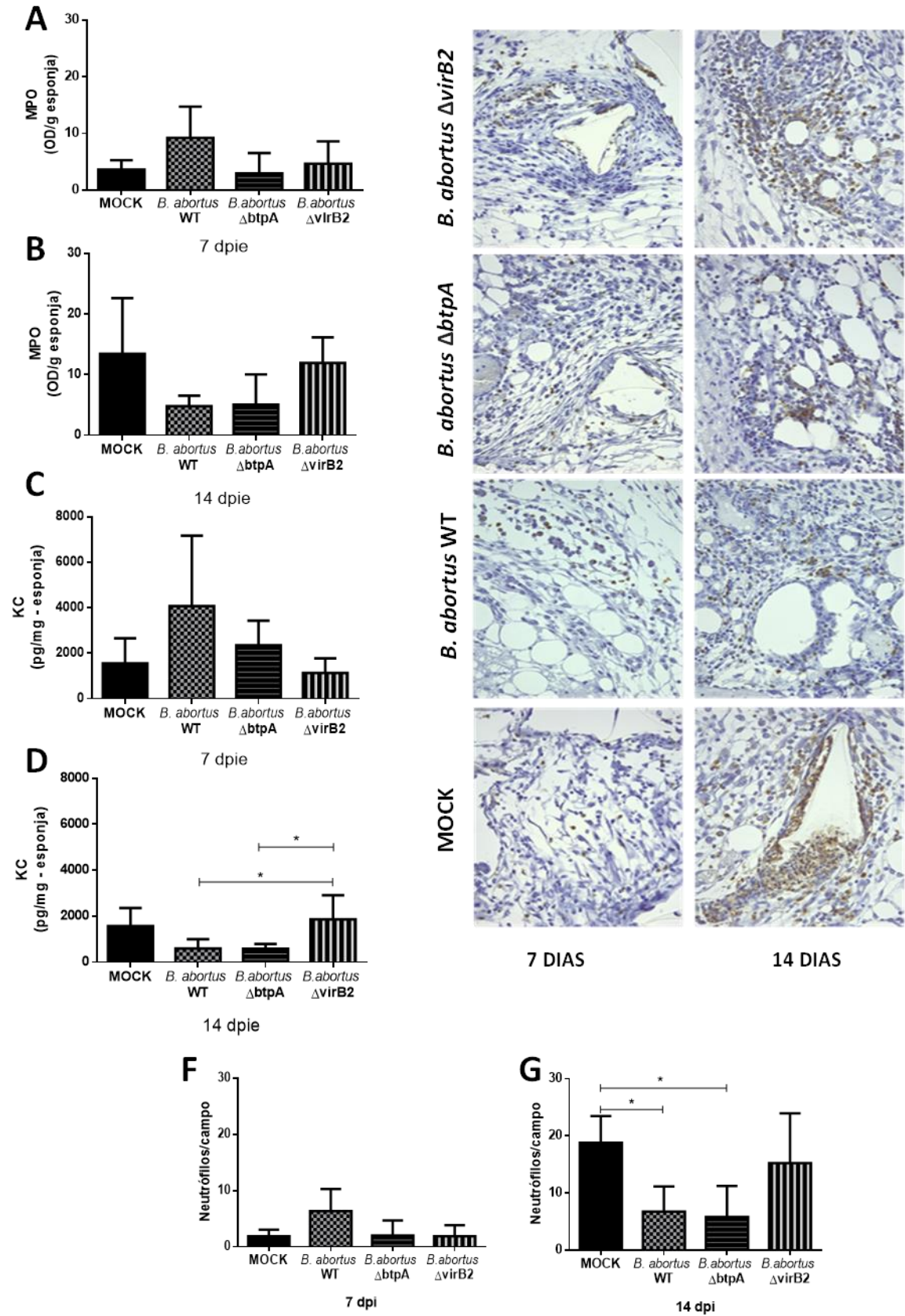


Figura 9: Quantificação de neutrófilos na esponja. Esponjas implantadas em camundongos (n=5) e infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* $\Delta btpA$, *B. abortus* $\Delta virB2$ e inoculado PBS (MOCK) como controle foram avaliadas aos sete e 14 dpie quanto a atividade da enzima mieloperoxidase (A e B), a concentração da citocina KC (C e D) e marcação imunoistoquímica de neutrófilos (40x) (E) e contagem morfométrica pelo software ImageJ (F e G). Resultado considerado significativo quando o $*P < 0.05$. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

Quantificação de macrófagos ativados

A enzima N-acetil-b-D-glicosaminidase (NAG) está presente nos macrófagos ativados e pode ser facilmente quantificada (Pereira et al., 2012; Socarrás et al., 2014). Aos 7 dpie, houve maior atividade de NAG no grupo infectado com a cepa de *B. abortus* 2308 comparada aos demais grupos ($*P < 0,05$) (Figura 10A). Aos 14 dpie notou-se uma redução de NAG na cepa WT quando comparado aos grupos $\Delta virB2$ e PBS ($*P < 0,05$), demonstrando a capacidade da *B. abortus* de modular a atividade dos macrófagos na lesão (Figura 10B). O CCL2, uma das quimiocinas que participam do recrutamento de macrófagos, foi mensurado na esponja e observamos que aos 7 dpie, a concentração CCL2 foi maior no grupo *B. abortus* 2308 do que nos demais grupos ($*P < 0,05$), enquanto que aos 14 dpie houve redução de CCL2 no grupo *B. abortus* 2308 e aumento nos grupos $\Delta virB2$ e PBS ($*P < 0,05$) (Figura 10C e D). Células gigantes multinucleadas que são macrófagos fundidos presentes no tecido inflamatório, foram observadas somente aos 14dpie, e apenas nos grupos $\Delta virB2$ e PBS (Figura 10 E e F).

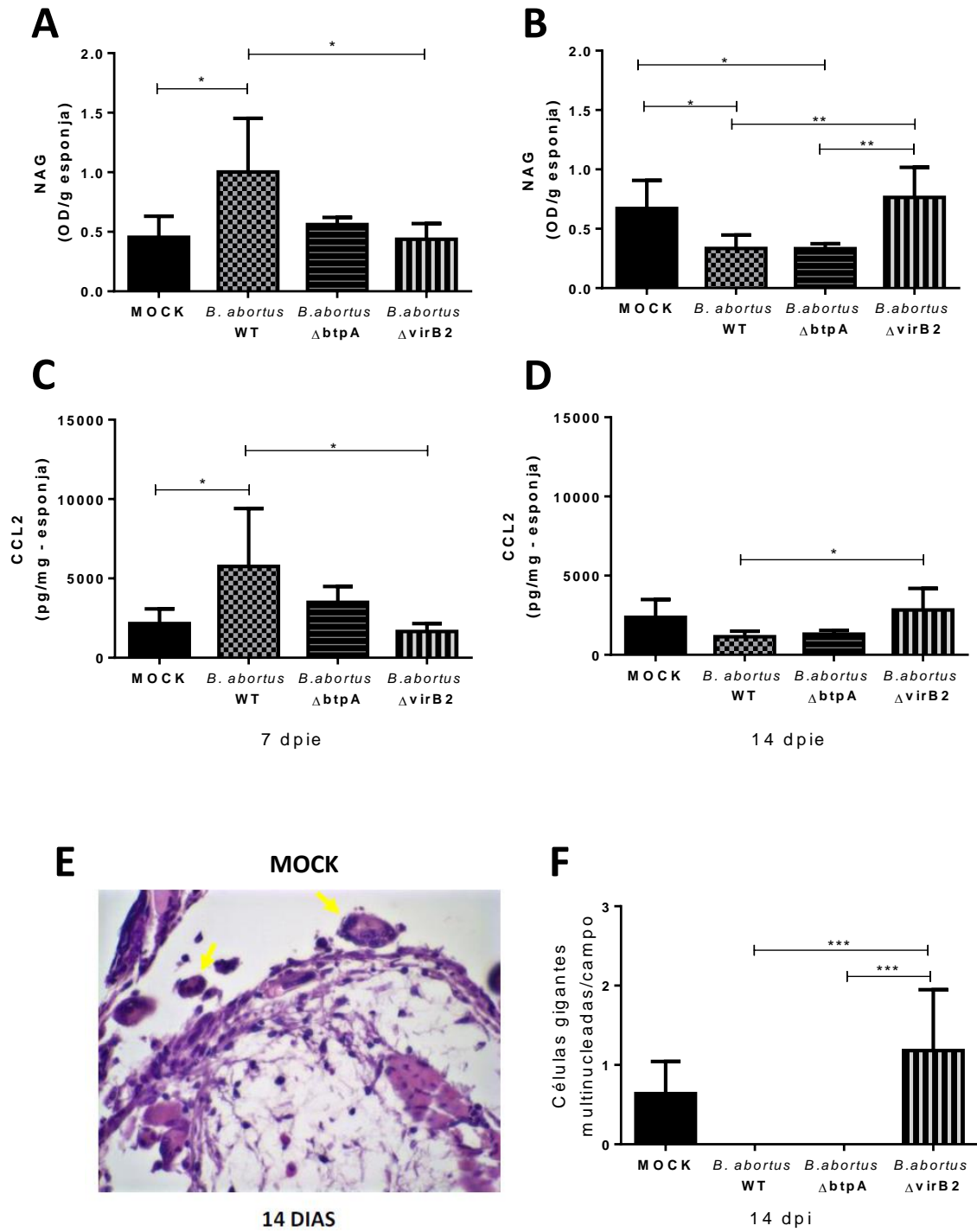


Figura 10: Quantificação de macrófagos na esponja. Esponjas implantadas em camundongos (n=5) e infectadas com 1×10^4 UFC de *Brucella abortus* 2308 (WT), *B. abortus* Δ btpA, *B. abortus* Δ virB2 e inoculado PBS (MOCK) como controle foram avaliadas aos 7 e 14 dpi quanto a atividade da enzima N-acetil-b-D- glicosaminidase (A e B), a concentração da citocina CCL2 (C e D) e a contagem de células gigantes multinucleadas (seta amarela) por campo foi realizada em H&E, aumento de (60x) (E e F). Resultado considerado significativo quando o $*P < 0.05$. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que estuda o perfil inflamatório induzido pela infecção por *B. abortus* em modelo *in vivo* utilizando uma plataforma de biomaterial sintético, no qual, observamos que *B. abortus* tem a capacidade de modular a inflamação *in vivo* em modelo de esponja e que SST4 funcional, mas não BtpA, influencia significativamente no perfil inflamatório. A inflamação é uma reação importante da resposta imune contra infecção, porém, um estímulo inflamatório persistente, como o que ocorre na infecção por *B. abortus*, leva a uma inflamação crônica que pode ocasionar lesões graves fatais ou debilitantes no hospedeiro. O estudo da inflamação é importante para poder entender quais são os tipos celulares que influenciam na modulação da infecção e no estabelecimento das lesões associada a brucelose.

Nós mostramos que *B. abortus* 2308, *B. abortus* $\Delta btpA$ são capazes de sobreviver e se replicar no implante sintético, e disseminar sistemicamente, como demonstrado na recuperação bacteriana do baço. Já *B. abortus* $\Delta virB2$, assim como em outros estudos *in vivo*, é incapaz de persistir com a infecção neste modelo (Sun et al., 2002; den Hartingh et al., 2004; Rolán e Tsois, 2007), demonstrando que o SST4 é essencial para a persistência da *B. abortus* no hospedeiro. É interessante notar que a depleção de BtpA não interfere com a sobrevivência e replicação intracelular da bactéria, e conseqüentemente com estabelecimento e persistência da infecção no modelo murino, assim como demonstrado em outros artigos que avaliam a depleção de BtpB ou uma dupla depleção de BtpA e BtpB (Salcedo et al., 2013; Hielpos et al., 2017). Em experimentos *in vivo* utilizando mutantes deficientes de SST4, demonstram que essas cepas conseguem sobreviver no baço dos camundongos até três dias após a infecção de forma semelhante à cepa selvagem (Rolán and Tsois, 2007), porém, após o período inicial da infecção, as bactérias selvagens conseguem sobreviver e replicar, enquanto que as cepas mutantes são eliminadas (Rolán and Tsois, 2007; Den Hartigh et al., 2008). Interessantemente observado neste estudo, é que *B. abortus* selvagem tem habilidade de replicar também na esponja.

Este estudo demonstrou com análise do perfil inflamatório na esponja, baseado em produção de citocinas e quimiocinas, migração de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, formação de tecido de granulação e inflamação granulomatosa, que *B. abortus* é capaz de interferir no processo, impedindo ou retardando o estabelecimento do tecido inflamatório na matriz sintética. Estes achados colaboram para o conceito de que *Brucella* é uma bactéria patogênica que induz uma resposta inflamatória inicial fraca ou silenciosa (Paixão et al., 2009; Barquero-calvo et al., 2007; Carvalho Neta et al., 2008). O sucesso da capacidade furtiva de *Brucella* envolve as características estruturais do envelope bacteriano, que

são capazes de evitar seu reconhecimento pelo sistema imunológico inato (Atluri et al., 2011; Barquero-calvo et al., 2007), como por exemplo, o LPS baixa endotoxicidade, sendo mal sinalizado pelo TLR4 (Lapaque et al., 2005; Cardoso et al., 2006), a não ativação do TLR5 devido à ausência de flagelo, expressão de proteínas semelhante a ao domínio TIR, que são capazes de interferir com a sinalização de diferentes receptores TLR (Radhakrishnan et al., 2009; Salcedo et al., 2013; Hielpos et al., 2017; Salcedo et al., 2008).

O perfil inflamatório observado na esponja com PBS foi semelhante aos outros trabalhos prévios que utilizam este modelo de biomaterial sintético (Marques et al., 2011; Orellano et al., 2018; Campos et al., 2006), mesmo implantando duas esponjas ao invés de uma esponja. Com este estudo podemos observar que o implante simultâneo de duas esponjas no subcutâneo do camundongo permite avaliação em um mesmo animal da produção de citocinas e migração de células inflamatórias e tecido fibrovascular aos 14 dpi. Aos sete dpi há pouca infiltração celular e formação de tecido fibrovascular, que pode justificar não detecção de diferença entre os grupos na maioria das análises realizadas.

Este estudo demonstrou ainda que a interferência de *B. abortus* no perfil inflamatório é dependente de SST4 funcional. Embora menor quantidade de bactéria possa justificar diferença no perfil inflamatório entre grupos *B. abortus* 2308 e $\Delta virB2$, não explica o mesmo perfil inflamatório observado nas esponjas dos grupos $\Delta virB2$ e PBS. Estudos prévios demonstram que SST4 é importante para indução de resposta inflamatória causada por *Brucella* spp. no hospedeiro. *B. abortus* é capaz de induzir expressão de genes relacionados a resposta imune mediada por IFN- γ , em baço de camundongos nos primeiros dias após infecção, enquanto que as mutantes deficientes de SST4 não conseguem (Roux et al., 2007). Rolán and Tsolis, 2008 demonstraram que a maior produção de IFN- γ em camundongos infectados com *B. abortus* com SST4 funcional pode influenciar no curso da lesão inflamatória granulomatosa (Rolán et al., 2009).

A produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é induzida na infecção por *B. abortus* (Byndloss and Tsolis, 2015). Neste estudo, mostramos que *B. abortus* induz de forma significativa a produção de IFN- γ , mas não de IL-10 aos 14 dpi, embora induza uma maior produção de IL-10 do que IFN- γ aos sete dpi. Interessantemente, mesmo com o aumento dos níveis de IFN- γ , *B. abortus* 2308 conseguiu ainda sobreviver e multiplicar na esponja com sete e com 14 dpi, indicando IFN- γ produzido localmente, não é suficiente para controlar a infecção na esponja. Como *Brucella* spp. possui a capacidade de entrar na célula do hospedeiro e chegar ao seu sítio de replicação de forma silenciosa, a posterior ativação do macrófago não é suficiente para inibir o crescimento da bactéria (Salcedo et al., 2008). A resposta imune

desencadeada pela infecção por *Brucella* com SST4 funcional está relacionada à produção de IFN- γ , que auxilia na resposta imune tipo T helper 1, resposta considerada protetora contra bactérias intracelulares como *Brucella* sp. (Rolán and Tsolis, 2007; Rolán and Tsolis, 2008). A IL-10 é considerada uma citocina imunoregulatória, capaz de inibir a ativação de macrófagos e dendríticas, sendo conhecida principalmente por afetar a produção de citocinas Th1, incluindo o IFN- γ (Xavier et al., 2013a; Corsetti et al., 2013). Embora ausência de IL-10 favorece o controle da infecção por *B. abortus*, reduzindo a carga bacteriana, camundongos infectados apresentam lesões inflamatórias mais agudas e mais graves (Xavier et al., 2013a).

Sabe-se que na fase aguda da infecção por *Brucella*, tem a secreção de citocinas, cujo papel envolve promover a resposta imune e inflamatória entre as citocinas, o TNF- α é responsável por promover o recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção (Zhan et al., 1996) e TGF- β 1 está relacionado com a inflamação crônica, por favorecer o processo de reparo (Byndloss and Tsolis, 2015). Embora diversos estudos demonstrem interferência de *B. abortus* na produção TNF- α (Gomes et al., 2012; Xavier et al., 2013a; Oh and Li, 2013) não detectamos diferença entre os grupos no modelo de esponja. A maior concentração nível de TGF- β 1 nos grupos *B. abortus* Δ virB2 e PBS quando comparado ao grupo *B. abortus* 2308, indica que houve uma menor produção dessa citocina neste grupo, provavelmente devido ao não estabelecimento do tecido fibrovascular, rico em macrófagos produtores de TGF- β 1.

A primeira linha de defesa da resposta inata é composta de células inflamatórias, como os neutrófilos, monócitos/macrófagos (Byndloss and Tsolis, 2016; Gomes et al., 2012). Tanto o implante de esponja que leva a formação de uma resposta tipo corpo estranho, como a infecção por *Brucella abortus*, induzem o influxo dessas células inflamatórias. Após a infecção, os neutrófilos são as primeiras células a fagocitar *B. abortus*, estas células são então ativadas, liberam citocinas e formam armadilhas extracelulares de neutrófilo (Barquero-Calvo et al., 2013). No entanto, *Brucella* consegue sobreviver dentro dos neutrófilos por um período prolongado (Kreutzer et al., 1979), podendo servir como veículos para a dispersão bacteriana (Gutiérrez-Jiménez et al., 2019). Em contraste com o envolvimento do neutrófilos, os macrófagos representam um papel central na infecção por *B. abortus*. Essas células permitem a multiplicação e sobrevivência da bactéria nos estágios iniciais, porém nos estágios posteriores são as principais células responsáveis pela eliminação da mesma. Ao entrar no macrófago, *B. abortus* remodela os fagossomos, evita a fusão de endossomos e lisossomos tardios, forma vacúolos contendo *Brucella* (BCVs) no retículo endoplasmático e estabelece seu nicho de replicação (Hong et al., 2000; Comerci et al., 2001). Na fase inicial da infecção, *Brucella* é capaz de prolongar a vida de macrófagos (M ϕ) e evitar a autofagia (Gross et al. al., 2000; Gorvel e

Moreno, 2002; Barquero-Calvo et al., 2007). O perfil inflamatório na esponja demonstrou que *B. abortus* é capaz de interferir no processo, por meio da atuação na migração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, na formação de tecido de granulação e na inflamação granulomatosa, impedindo ou retardando o estabelecimento do tecido inflamatório na matriz sintética. Estes achados concordam com estudos prévios que demonstram que *B. abortus* induz uma resposta inflamatória inicial fraca ou silenciosa (Barquero-Calvo et al., 2007). O sucesso da capacidade furtiva da *Brucella* envolve as características estruturais do envelope bacteriano, que são capazes de evitar seu reconhecimento pelo sistema imunológico inato (Barquero-Calvo et al., 2007), como por exemplo, o LPS liso de *Brucella* que possui baixa endotoxicidade, levando a má sinalização via TLR4 (Barquero-Calvo et al., 2007), a não ativação do TLR5 devido à ausência de flagelo, além da proteína semelhante a TIR, que interfere na sinalização de diferentes receptores TLR (Cirl et al, 2008; Salcedo et al., 2008; Radhakrishnan et al., 2009).

Embora vários estudos tenham investigado o papel dos fatores de virulência e mecanismos de evasão de *Brucella* frente à resposta imune (Comerci et al., 2001; Gorvel e Moreno, 2002; Rolán et al., 2009; Jong et al., 2010), a caracterização da resposta inflamatória induzida pela infecção por *Brucella abortus* em implantes no subcutâneo de camundongo não havia sido realizada. Neste trabalho, a participação do processo inflamatório nas alterações encontradas na esponja foi avaliada quanto à atividade de enzimas e citocinas inflamatórias.

A atividade de mieloperoxidase (MPO) é utilizada para indicar o recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, visto que os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo (Gallet et al., 2011; Nunes et al., 2011). Além de sintetizar mediadores pró- inflamatórios, os neutrófilos são importantes para o recrutamento de macrófagos (Wright et al., 2010). Porém, neste trabalho não houve diferença significativa do recrutamento de neutrófilos nos grupos com sete e 14 dpie. Já na análise da enzima *N*-acetil- β -*D*-glicosaminidase (NAG), que está presente em macrófagos ativadas, foi observado que a ativação de macrófagos com sete dpie foi maior no grupo *B. abortus* 2308 quando comparado com o grupo $\Delta virB2$ e PBS.

E, esse resultado se inverteu ao 14 dpie, mostrando que *Brucella abortus* conseguiu reduzir a infiltração de macrófagos para a esponja. O KC e CCL2 são quimiocinas responsáveis por atrair neutrófilos e macrófagos respectivamente para a infecção. Como observado em outros artigos (Salcedo et al., 2013; Hielpos et al., 2017) e em nosso trabalho, *Brucella abortus* e $\Delta btpA$, levam a expressão dessas quimiocinas com sete dias de infecção, porém, possuem a capacidade de inibi-las, ao contrário da $\Delta virB2$ e PBS que passam a superestimular as

quimiocinas mencionadas ao longo do curso infeccioso. De forma geral, a infecção por *B. abortus* atrai neutrófilos e macrófagos no início da infecção, porém, esse perfil muda com o tempo, demonstrando a capacidade da *B. abortus* de modular a resposta inflamatória.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que *Brucella abortus* 2308 influencia na migração de células inflamatórias, que a deficiência de *btpA* induz um perfil inflamatório semelhante a cepa wt 2308 *in vivo* no modelo de implante sintético. A deficiência do *SST4* influencia na sobrevivência intracelular e no curso da inflamação no modelo murino de implante sintético.

REFERENCIAS

- Aderem, A. e Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.
- Almeida, L. A.; Macedo, G. C.; Marinho, F. A. V.; Gomes, M. T. R.; Corsetti, P. P.; Silva, A. M.; Cassataro, J.; Giambartolomei, G. H.; Oliveira, S. C. Toll-Like Receptor 6 Plays an Important Role in Host Innate Resistance to *Brucella abortus* Infection in Mice. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 1654–1662, 2013.
- Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. Foreign Body Reaction to Biomaterials. **Seminars Immunology**, v. 20, p. 86–100, 2008.
- Andrade, S. P.; Machado, R. D.; Teixeira, A. S.; Belo, A. V.; Tarso, A. M.; Beraldo, W. T. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. **Microvascular Research**, v. 54, p. 253-261, 1997.
- Arellano-Reynoso, B.; Lapaque, N.; Salcedo, S.; Briones, G.; Ciocchini, A. E.; Ugalde, R.; Moreno, E.; Moriyon, I.; Gorvel, J. P. Cyclic b-1, 2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. **Nature immunology**, v. 6, p.618-625, 2005.
- Atluri, V. L.; Xavier, M. N.; Jong, M. F.; den Hartigh, A. B.; Tsolis, R. M. Interactions of the Human Pathogenic *Brucella* Species with Their Hosts. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p.523–541, 2011.
- Baldwin, C. L. e Goenka, R. Host Immune Responses to the Intracellular Bacteria *Brucella*: Does the Bacteria Instruct the Host to Facilitate Chronic Infection?. **Critical Reviews in Immunology**, v.26, p. 407–442, 2006.
- Barquero-calvo, E.; Chaves-Olarte, E.; Weiss, D.S.; Guzmán-Verri, C.; Chacón-Díaz, C.; Rucavaddo, A.; Moriyón, I.; Moreno, E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. **Plos One**, v.2, p.1-14, 2007.
- Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, V. Foulongne, S. Michaux-Charachon, G. Bourg, A. Allardet-Servent, C. Cazevieille, J. P. Liautard, M. Ramuz e D. O’Callaghan. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p.1544–1549, 2002.
- Brasil. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasil. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, p. 190, 2006.
- Byndloss, M. X. e Tsolis, R. M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity. **Annual Review of Animal Biosciences**, v.4, p. 9.1–9.17, 2015.
- Byndloss, M. X. e Tsolis, R. M. Chronic Bacterial Pathogens: Mechanisms of Persistence. **Microbiology Spectrum**, v. 4, p. 1-17, 2016.
- Campos, M. A.; Rosinha, G. M. S.; Almeida, I. C.; Salgueiro, X. S.; Jarvis, B. W.; Splitter, G. A. Role of Toll-Like Receptor 4 in Induction of Cell-Mediated Immunity and Resistance to *Brucella abortus* Infection in Mice. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 176–186, 2004.

- Campos, P.P.; Andrade, S.P.; Moro, L.; Ferreira, M. A. N. D.; Vasconcelos, A. C. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histology Histopathology**, v.21, p. 1263-1270, 2006.
- Campos, P. P.; Vasconcelos, A. C.; Ferreira, M. A. N. D.; Andrade, S. P. Alterations in the dynamics of inflammation, proliferation and apoptosis in subcutaneous implants of lupus-prone mice. **Histology Histopathology**, v. 26, p. 433-442, 2011.
- Cardoso, P. G.; Macedo, G. C.; Azevedo, V.; Oliveira, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p.1-11, 2006.
- Carvalho Neta, A. V.; Stynen, A. P. R.; Paixão, T. A.; Miranda, K. L.; Silva, F. L.; Roux, C. M.; Tsolis, R. M.; Everts, R. E.; Lewin, H. A.; Adams, L. G.; Carvalho, A. F.; Lage, A. P.; Santos, R. L. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 1897–1907, 2008.
- Carvalho Neta, A. V.; 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.
- Celli, J., Chastellier, C.; Franchini, D. M.; Pizarro-Cerda, J.; E. Moreno, E.; e J. P. Gorvel, J. P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p.545–556, 2003.
- Chalothorn, D., Clayton, J. A.; Zhang, H.; Pomp, D.; Faber, J. E. Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. **Physiol. Genomics**, v. 30, p. 179–191, 2007.
- 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 medicine**, v.14, p. 399-406, 2008.
- Comerci, D.; Martínez-Lorenzo, M. A.; Sieira, R.; Gorvel, J.-P.; Ugalde, R. A. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. **Cellular Microbiology**, v.3, p. 159-168, 2001.
- Copin, R.; DE Baetselier, P.; Carlier, Y.; Letesson, J. J.; Muraille, E. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. **Journal of Immunology**, v.178, p.5182-5191, 2007.
- Corbel, M. J. Recent advances in brucellosis. **Journal Medicine Microbiology**, v. 46, p. 101-103, 1997.
- Corsetti, P. P.; Almeida, L. A.; Carvalho, N. B.; Azevedo, V.; Silva, T. M. A.; Teixeira, H. C.; Faria, A. C.; Oliveira, S. C. Lack of Endogenous IL-10 Enhances Production of Proinflammatory Cytokines and Leads to *Brucella abortus* Clearance in Mice. **PLoS One**, v. 8, p. 1-11, 2013.
- Dean, A. S.; Crump, L.; Greter, H.; Hattendorf, J.; Schelling, E.; Zinsstag, J. Clinical Manifestations of Human Brucellosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-9, 2012.
- Den Hartigh, A. B.; Sun, Y-H.; Sondervan, D.; Heuvelmans, N.; Reinders, M. O.; Ficht, T. A.; Tsolis, R. M. Differential Requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* Infection. **Infection and Immunity**, v. 72, p.5143–5149, 2004.

Den Hartigh, A. B.; Rolan, H. G.; Jong, M. F.; Tsolis, R. M. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but Not VirB7, Are Essential for Mediating Persistence of *Brucella* in the Reticuloendothelial System. **Journal of Bacteriology**, v. 90, p. 4427–4436, 2008.

Enright, F. M., L. N. Araya, P. H. Elzer, G. E. Rowe, A. J. Winter. Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 26, p.171-182, 1990.

Falagas, M. E. e Bliziotis, I. A. Quinolones for Treatment of Human Brucellosis: Critical Review of the Evidence from Microbiological and Clinical Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 22–33, 2006.

Fernandes, D. M. e Baldwin, C. L. Interleukin-10 Downregulates Protective Immunity to *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1130–1133, 1995.

Fernandes, D. M.; Jiang, X.; Jung, J. H.; Baldwin, C. L. “Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308,”. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 16, p. 193–203, 1996.

Fernandez-Lago, L.; Montana, M.; Chordi, A. Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v. 15, p.109-114, 1996.

Fugier, E.; Pappas, G.; Gorvel, J. P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 9, p. 1-10, 2007.

Gallet, P.; Phulpin, B.; Merlin, J.L.; Leroux, A.; Bravetti, P.; Mecellem, H.; Tran, N.; Dolivet, G. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissue and relation with histological severity scoring. **PLoS ONE**, v.6, p. 1-10, 2011.

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.; Dahouk, S. AL.; Neubauer, H.; Letesson, J-J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p.118– 131, 2011.

Gomes, M. T. R.; Campos, P. C.; Almeida, L. A.; Oliveira, F. S.; Costa, M. M. S.; Marim, F. M.; Pereira, G. S. M.; Oliveira, S. C. The role of innate immune signals in Immunity to *Brucella abortus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-9, 2012.

Gomes, M. T.; Campos, P. C.; Pereira, G. S.; Bartholomeu, D. C.; Splitter, G.; Oliveira, S. C. TLR9 is required for MAPK/NF-κB activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, p. 771–780. 2016.

Gorvel, J.P.; Moreno, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.281–297, 2002.

Guzmán-Verri, C.; González-Barrientos, R.; Hernández-Mora, G.; Morales, J-A.; Baquero-Calvo, E.; Chaves-Olarte, E.; Moreno, E. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-22, 2012.

Hielpos, M. S.; Ferrero, M. C.; Fernández, A. G.; Falivene, J.; Vanzulli, S.; Comerci, D. J.; Baldi, P. C. Btp Proteins from *Brucella abortus* modulate the lung innate immune response to infection by the respiratory route. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-10, 2017.

- Hollett, R. B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, p. 575–587, 2006.
- Hong, P.; Tsolis, R. E. M.; Ficht, T. A. Identification of Genes Required for Chronic Persistence of *Brucella abortus* in Mice. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4102–4107; 2000.
- Horiuchi, T.; Mitoma, H.; Harashima, S-I.; Tsukamoto, H.; Shimoda, T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agentes. **Rheumatology**, v. 49, p.1215–1228, 2010.
- Huang, L. Y.; Aliberti, J.; Leifer, C. A.; Segal, D. M. Sher, A.; Golenbock, D. T.; Golding, B. Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. **Journal of Immunology**, v.171, p.1441-1446, 2003.
- Huang, L. Y.; Ishii, K. J.; Akira, S.; Aliberti, J.; Golding, B. Th1-like cytokine induction by heatkilled *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. **Journal of Immunology**, v.175, p.3964-3970, 2005.
- Hull, N. C. e Schumaker, B. A. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 8, p. 1-12, 2018.
- Jong, M. F.; Rolán, H. G.; Tsolis, R. M. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. **Cellular Microbiology**, v. 12, p.1195–1202, 2010.
- Ke, Y.; Wang, Y.; Li, W.; Chen, Z. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5,p. 1-10, 2015.
- Khan, M. Y.; Mah, M. W.; Memish, Z. A. Brucellosis in Pregnant Women. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1172–1177, 2001.
- Ko, J. e Splitter, G. A. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p. 65–78, 2003.
- Krueger, W. S.; Lucero, N. E.; Brower, A.; Heil, G. L. Gray, G. C. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. **Zoonoses Public Health**, v.61, p.509-18, 2014.
- Lacey, C. A.; Mitchell, W. J.; Brown, C. R.; Skyberg, J. A. Temporal Role for MyD88 in a Model of *Brucella*-Induced Arthritis and Musculoskeletal Inflammation. **Infection and Immunity**, v. 85, p. 1-12, 2017.
- Lage, A. P.; Poester, F. P.; Paixão, T. A.; Silva, T. M. A.; Xavier, M. N.; Minharro, S.; Miranda, K. L.; Alves, C. M.; Mol, J. P. S.; Santos, R. L. Brucelose bovina: uma atualização - Bovine brucellosis: an updated review. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, p.202-212, 2008.
- Lapaque, N.; Moriyon, I.; Moreno, E.; Gorvel, J. P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.60–66, 2005.
- Laschke, M.W.; Häufel, J.M.; Thorlacius, H.; Menger, M. D. New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials *in vivo*. **Journal of Biomedical Material Research A**, v.74, p.696-704, 2005.
- Lawinsky, M. L. de J.; Ohara, P. M.; Elkhoury, M. da R.; Faria, N. do C.; Cavalcante, K. R. L. J. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, p.75-84, 2010.

- Lazari, M. G. T.; Pereira, L. X.; Viana, C. T. R.; Orellano, L. A. A.; Almeida, S. A.; Vasconcelos, A. C.; Ribeiro, G. B.; Couto, L. C.; Andrade, S. P.; Campos, P. P. Induction of liver proliferation using a polymeric platform in mice. **Life Sciences**, v. 193, p. 226-233, 2018.
- Lemos, T. S.; Cequinel, J. C.; Costa, T. P.; Navarro, A. B.; Sprada, A.; Shibata, F. K.; Gondolfo, R.; Tuon, F. F. Outbreak of human brucellosis in Southern Brazil and historical review of data from 2009 to 2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p.1-12, 2018.
- Lima, L. D. C.; Andrade, S. P.; Campos, P. P.; Barcelos, L. S.; Soriani, F. M.; Moura, S. A. L.; Ferreira, M. A. N. D. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-9, 2014.
- López-Goñi, C.; Guzmán-Verri, L.; Manterola, A.; Sola-Landa, A.; Moriyón, I.; Moreno, E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.329–339, 2002.
- Macedo, G. C.; Magnani, D. M.; Carvalho, N. B.; Bruna-Romero, O.; Gazzinelli, R. T.; Oliveura, S. C. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **Journal of Immunology**, v.180, p.1080-1087, 2008.
- Mantur, B. G.; Amarnath, S. K.; Shinde, R. S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p.188-202, 2007.
- Marques, S. M.; Campos, P. P.; Castro, P. R.; Cardoso, C. C.; Ferreira, M. A.N.D.; Andrade, S. P. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvascular Research**, v.82, p. 246–252, 2011.
- Martinez de Tejada, G.; Pizarro-Cerda, J.; Moreno, E.; Moriyón, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. **Infection and immunity**, v. 63, p. 3054-3061, 1995.
- Mol, J. P. S.; França, S.A.; Paixão, T. A.; Santos, R. L. R. Laboratorial diagnosis of animal Brucellosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19,p. 117-126, 2012
- Mol, J. P. S.; Pires, S. F.; Chapeaurouge, A. D.; Perales, J. Santos, R. L.; Andrade, H. M.; Lage, A. P. Proteomic Profile of *Brucella abortus*- Infected Bovine Chorioallantoic Membrane Explants. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-16, 2016.
- Morais, J. M.; Papadimitrakopoulos, F.; Burgess, D. J. Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. **The AAPS Journal.**, v.12, p. 188-196, 2010.
- Moresco, E. M. Y.; Lavine, D.; Beutler, B. Toll-like receptors. **Current biology**, v. 21, p. 488-493, 2011.
- Murphy, E. A.; Parent, M.; Sathiyaseelan, J.; Jiang, X.; Baldwin, C. Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.32, p. 85-88, 2001.
- Murphy, E. A.; Sathiyaseelan, J.; Parent, M. A.; Zou, B.; Baldwin, C. L. “Interferon- γ is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice,” **Immunology**, v. 103, p. 511–518, 2001a.
- Nunes, P. S.; Albuquerque-Junior, R. L. C.; Cavalcante, D. R. R.; Dantas, M. D. M.; Cardoso, J. C.; Bezerra, M. S.; Souza, J. C. C.; Serafini, M. R.; Quintans-Jr, L. J.; Bonjardim, L. R.; Araújo, A. A. S. Collagen-based films containing liposome- loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

- O'Callaghan, D.; Cazeveille, C.; Allardet-Servent, A.; Boschioli, G. B.; Foulongne, V.; Frutos, Y. K.; Ramuz, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* *VirB* and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology*, v.33, p.1210–1220, 1999.
- Oh, S. A. e Li, M. O. TGF- β : Guardian of T Cell Function. *Journal of Immunology*, v.191, p. 3973–3979, 2013.
- Olsen, S. C. e Palmer, M. V. Advancement of Knowledge of *Brucella* over the Past 50 Years. *Veterinary Pathology*, v. 51, p. 1076-1089, 2014.
- Orellano, L. A. A.; Almeida, S. A.; Pereira, L. X.; Couto, L. C.; Lazari, M. G. T.; Viana, C. T. R.; Andrade, S. P.; Campos, P. P. Upregulation of Foreign Body Response in Obese Mice. *Obesity biology and integrated physiology*, v. 26, p. 531-539, 2018.
- Pappas, G.; Papadimitriou, P.; Akritidis, N.; Christou, L.; Tsianos, E. V. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, v.6, p. 91-99, 2006.
- Paixão, T. A.; Roux, C. M.; den Hartigh, A. B.; Sankaran-Walters, S.; Dandekar, S.; Santos, R. L.; Santos, R. M. Establishment of Systemic *Brucella melitensis* Infection through the Digestive Tract Requires Urease, the Type IV Secretion System, and Lipopolysaccharide O Antigen. *Infection and immunity*, v.77, p. 4197–4208, 2009.
- Pasquali, P., R. Adone, L. C. Gasbarre, C. Pistoia, F. Ciuchini. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infection and immunity*, v. 69, p.6541- 6544, 2001.
- Pereira, N. B.; Campos, P. P.; Socarrás, T. J. O.; Pimenta, T. S.; Parreiras, P. M.; Silva, S. S.; Kalapothakis, E.; Andrade, S. P.; Moro, L. Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. *Toxicon*, v.59, p. 672–679, 2012.
- Pereira, L. X.; Viana, C. T. R.; Orellano, L. A. A.; Almeida, S. A.; Vasconcelos, A. C.; Goes, A. M.; Birbrair, A.; Andrade, S. P.; Campos, P. P. Synthetic matrix of polyether polyurethane as a biological platform for pancreatic regeneration. *Life Sciences*, v.176, p.67–74, 2017.
- Pizarro-Cerdá, J.; Moreno, E.; Gorvel, J-P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and Infection*, v.2, p.829–835, 2000.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 9892–9898, 2009.
- Rafiei, A.; Hajilooi, M.; Shakib, R. J.; Alavi, S. A Transforming growth factor-b1 polymorphisms in patients with brucellosis: an association between codon 10 and 25 polymorphisms and brucellosis. *Clinical Microbiology and Infection*; v.13, p. 97–100, 2007.
- Robichaud, S.; Libman, M.; Behr, M.; Rubin, E. Prevention of Laboratory-Acquired Brucellosis. *Clinical Infectious Diseases*; v.38, p.119–22, 2004.
- Rolán, H. G. e Tsois, R. M. Mice Lacking Components of Adaptive Immunity Show Increased *Brucella abortus virB* Mutant Colonization. *Infection and Immunity*, v.75, p. 2965–2973, 2007.

- Rolán, H. G. e Tsolis, R. M. Inactivation of the Type IV Secretion System Reduces the Th1 Polarization of the Immune Response to *Brucella abortus* Infection. **Infection and Immunity**, v.76, p. 3207–3213, 2008.
- Rolán, H. G.; Xavier, M. N.; Santos, R. L.; Tsolis, R. M. Natural Antibody Contributes to Host Defense against an Attenuated *Brucella abortus virB* Mutant. **Infection and Immunity**, v.77, p. 3004–3013, 2009.
- Roset, M. S.; Ibanez, A. E.; Filho, J. A. S.; Spera, J. M.; Minatel, L.; Oliveira, S. C. *Brucella* Cyclic b-1,2-Glucan Plays a Critical Role in the Induction of Splenomegaly in Mice. **Plos one**, v. 9, p. 1-9, 2014.
- Roux, C. M.; Rolán, H. G.; Santos, R. L.; Beremand, P. D.; Thomas, T. L.; Adams, L. G.; Tsolis, R. M. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. **Cellular Microbiology**, v. 9, p.1851–1869, 2007.
- Sá, J. C.; Silva, T. M. A.; Costa, E. A.; Silva, A. P. C.; Tsolis, R. M.; Paixao, T. A.; Neta, A. V. C.; Santos, R. L. The virB-encoded type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice. **Veterinary Microbiology**, v.159, p.130–140, 2012.
- Salcedo, S. P.; Marchesini, M. I.; Lelouard, H.; Fugier, E.; Jolly, G.; Balor, S.; Muller, A.; Lapaque, N.; Demaria, O.; Alexopoulou, L.; Comerci, D. J.; Ugalde, R. A.; Pierre, P.; Gorvel, J. P. *Brucella* Control of Dendritic Cell Maturation Is Dependent on the TIR-Containing Protein Btp1. **PLoS Pathogens**, v.4, p. 1-16, 2008.
- Salcedo, S. P.; Marchesini, M. I.; Degos, C.; Terwagne, M.; Bargen, K. V.; Lepidi, H.; Herrmann, C. K.; Lacerda, T. L. S.; Imbert, P. R. C.; Pierre, P.; Alexopoulou, L.; Letesson, J. J.; Comerci, D. J.; Gorvel, J. P. BtpB, a novel *Brucella* TIR containing effector protein with Immune modulatory functions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p. 1-13, 2013.
- Santos, R. L.; Martins, T. M.; Borges, A. M.; Paixão, T. A. Economic losses due bovine Brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v, 33, p. 759-764, 2013.
- Scholz, H.C.; Nockler, K.; Gollner, C.; Bahn, P.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Dahouk, S. A.; Kampfer, P.; Cloeckert, A.; Maquart, M.; Zygmunt, M. S.; Whatmore, A. M.; Pfeffer, M.; Huber, B.; Busse, H. J.; De, B. K. *Brucella inopinata* nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systemic and evolutionary microbiology**, v. 60, p. 801-808, 2010.
- Scholz HC, Muñhldorfer K, Shilton C, Benedict S, Whatmore AM, Blom J; Eisenberg, T. The Change of a Medically Important Genus: Worldwide Occurrence of Genetically Diverse Novel *Brucella* Species in Exotic Frogs. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-12, 2016.
- Sieira, R.; Comerci, D. J.; Sanchez, D. O.; Ugalde, R. A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 849–4855, 2000.
- Silva, T. M. A.; Costa, E. A.; Paixão, T. A.; Tsolis, R. M.; Santos, R. L. Laboratory animal models for brucellosis research. **Journal of biomedicine and biotechnology**, v. 2011, p.1-9, 2011.
- Skalsky, K.; Yahav, D.; Bishara, J.; Pitlik, S.; Leibovici, L.; Paul, M. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ**, v.336, p. 701–704, 2008.
- Socarrás, T. O.; Vasconcelos, A. C.; Campos, P. P.; Pereira, N. B.; Souza, J. P. C.; Andrade, S. P. Foreign Body Response to Subcutaneous Implants in Diabetic Rats. **PLOS ONE**, v.9, p. 1-10, 2014.

Solera, J.; Espinosa, A.; Geijo, P.; Martinez-Alfaro, E.; Sáez, L.; Sepulveda, A. M.; Ruiz-Ribó, M. D. Treatment of Human Brucellosis with Netilmicin and Doxycycline. **Clinical Infectious Diseases**; v.22, p.441-445, 1996.

Sorrentino, A.; Thakur, N.; Grimsby, S.; Marcusson, A.; Bulow, V. V.; Schuster, N. The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. **Nature cell biology**, v. 10, p. 1199- 1207, 2008.

Starr, T.; Ng, T. W.; Wehrly, T. D.; Knodler, L. A.; Celli, J. *Brucella* Intracellular Replication Requires Trafficking Through the Late Endosomal/Lysosomal Compartment. **Traffic**; v.9, p.678–694, 2008.

Suárez-Esquível, M., Ruiz-Villalobos, N., Jiménez-Rojas, C., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Víquez-Ruiz, E., Rojas-Campos, N., Baker, K. S., Oviedo-Sánchez, G., Amuy, E., Chaves-Olarte, E., Thomson, N. R., Moreno, E., Guzmán-Verri, C. *Brucella neotomae* Infection in Humans, Costa Rica. **Emerging infectious diseases**, v.23, p. 997-1000, 2017.

Sun, Y-H.; den Hartigh, A. B.; Santos, R. L.; Adams, G.; Tsolis, R. M. *VirB* Mediated Survival of *Brucella abortus* in Mice and Macrophages Is Independent of a Functional Inducible Nitric Oxide Synthase or NADPH Oxidase in Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4826–4832, 2002.

Traxler, R. M., Lehman, M. W., Bosserman, E. A., Guerra, M. A., & Smith, T. L. A literature review of laboratory-acquired brucellosis. **Journal of clinical microbiology**, v.51, p. 3055-62, 2013.

Tuon, F. F.; Gondolfo, R. B.; Cerchiari, N. Human-to-human transmission of *Brucella* – a systematic review. **Tropical Medicine and International Health**, v.22, p.539–546, 2017.

Viana, C. T. R.; Castro, P. R.; Marques, S. M.; Lopes, M. T. P.; Gonçalves, R.; Campos, P. P.; Andrade, S. P. Differential Contribution of Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. **PLoS ONE**, v.10, p. 1-17, 2015.

Vieira, A. L. S. (2012). Participação dos receptores TLR2, TLR4, TLR9 e da molécula adaptadora myd88 na infecção por *Brucella ovis* em camundongos c57/bl6 e a proteína TcpB como fator de virulência para *Brucella ovis*. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Waksman, G.; Orlova, E. V. Structural organization of the type IV secretion systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, p.24–31, 2014.

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, p. 5137–5143, 2005.

Wright, H.L.; Moots, R.T.; Bucknall, R.C.; Edwards, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v.49, p.1618-31, 2010.

Xavier, M. N.; Paixao, T. A.; Poester, F. P.; Lage, A. P.; Santos, R. L. Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, p.149-157, 2009.

Xavier, M. N.; Paixão, T. A.; den Hartigh, A. B.; Tsolis, R. M.; Santos, R. L. Pathogenesis of *Brucella* spp.. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.109-118, 2010.

Xavier, M. N.; Winter, M. G.; Spees, A. M.; Nguyen, K.; Atluri, V. L.; Silva, T. M. A.; Baumler, A. J.; Muller, W.; Santos, R. L.; Tsolis, R. M. CD4+ T Cell-derived IL-10 Promotes *Brucella abortus* Persistence via Modulation of Macrophage Function. **PLoS Pathogens**, v.9, p. 159-170, 2013.

Yagupsky, P. e Baron, E. J. Laboratory Exposures to Brucellae and Implications for Bioterrorism. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1180- 1185, 2005.

Zhan Y. e Cheers, C. “Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection,” **Infection and Immunity**, v. 61, p.4899–4901, 1993.

Zhan, Y.; Liu, Z.; Cheers, C. Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-12 Contribute to Resistance to the Intracellular Bacterium *Brucella abortus* by Different Mechanisms. **Infection and Immunity**, v.64, p. 2782–2786, 1996.