

RESUMO

A *Brucella ovis* é uma importante causa de epididimite em ovinos e conseqüentemente ocasiona perdas econômicas para a ovinocultura por afetar a reprodução dos animais. Considerando a escassez de estudos sobre como a *B. ovis* interage com componentes dos sistema imunológico inato, como os receptores semelhante a Toll (TLR), este trabalho caracterizou a importância da sinalização por TLR para o controle da infecção por *B. ovis* e a proteína TcpB, descrita anteriormente como mecanismo de evasão da sinalização TLR em *B. abortus* e *B. melitensis*. Camundongos C57/BL6 *knockout* para TLR2, TLR4, TLR9 e MyD88 foram infectados com *B. ovis* e submetidos a eutanásia após sete dias de infecção (dpi) para avaliação bacteriológica, histopatológica e número de cópias de RNA. Observou-se que os camundongos MyD88^{-/-} apresentaram maior colonização esplênica quando comparados com os camundongos C57/BL6 selvagens. Este aumento de susceptibilidade ocorreu devido ao menor desenvolvimento de resposta inflamatória destes animais, demonstrado por menor inflamação em baço e fígado e menor transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, necessárias para o desenvolvimento adequado de resposta contra *Brucella*. Os animais TLR9^{-/-} também apresentaram maior colonização bacteriana esplênica quando comparados com camundongos selvagens mas, interessante desenvolveram uma resposta inflamatória maior que o grupo controle. Em comparação com camundongos selvagens, animais TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} não apresentaram diferenças de susceptibilidade à infecção por *B. ovis*. Portanto, MyD88 é necessário para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória eficaz contra *B. ovis* no modelo murino. Adicionalmente, foi gerado uma amostra mutante de *B. ovis* construída a partir da deleção do gene *tcpB* e a cinética de infecção foi realizada em camundongos C57/BL6. A ausência deste gene acarretou em fenótipo atenuado *in vivo* caracterizado pela menor colonização bacteriana desde o primeiro dpi e incapacidade de persistir no hospedeiro até 30 dpi. Contudo, esta amostra mutante apresentou uma deficiência de crescimento *in vitro*. Portanto, a proteína TcpB funcional é necessária para a virulência e sobrevivência de *B. ovis* em camundongos, mas estudos bacteriológicos com o mutante desenvolvido neste estudo devem ser realizados para determinar se a amostra apresenta um defeito metabólico ou de crescimento.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, camundongos, TLR9, MyD88, TcpB.

ABSTRACT

Brucella ovis is a significant cause of epididymitis and thus causes economic loss to the sheep industry by affecting animal reproduction. Considering the scarcity of studies on the interaction of *B. ovis* with innate system components, such as Toll-like receptors (TLR), this work highlights the importance of TLR signalling to resistance to *B. ovis* and the protein TcpB, described as an evasion mechanism of TLR signaling in *B. abortus* and *B. melitensis*, as a virulence factor. C57/BL6 knockout for TLR2, TLR4, TLR9, and MyD88 mice were infected with *B. ovis* and euthanized after seven days of infection (dpi) for bacteriologic, histopathologic and gene expression evaluation. MyD88^{-/-} mice showed higher spleen colonization when compared with wild-type C57/BL6 mice. This increase in susceptibility was due to smaller inflammatory response in these animals, demonstrated by smaller inflammation in spleen and liver and smaller transcription of proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, necessary for proper response against *Brucella*. TLR9^{-/-} mice also presented larger spleen bacterial colonization in comparison with wild-type mice, having, however, developed larger inflammatory response than the control group. TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} mice showed no different susceptibility to *B. ovis* infection in comparison with wild-type mice. Therefore, MyD88 is necessary for the development of efficient inflammatory response against *B. ovis* in the murine model. Additionally, a mutant strain of *B. ovis* was generated from the deletion of the *tcpB* gene. *B. ovis* $\Delta tcpB$ was inoculated in C57/BL6 mice and the infection kinetic was carried out. The absence of this gene resulted in *in vivo* attenuated phenotype, characterized by smaller bacterial colonization from 1 dpi and lack of capacity to persist in host. However, this mutant strain showed a growth defect *in vitro*. Therefore, the functional protein TcpB is necessary for *B. ovis* virulence and survival in mice, but further bacteriological studies of the mutation developed in this work should be carried out to determine if the sample shows a metabolic or growth defect.

Key words: *Brucella ovis*, mice, MyD88, TcpB.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é o segundo sistema de criação de animais com maior importância em países desenvolvidos (Morand-Fehr e Boyazoglu, 1999). No Brasil, a exploração desses animais é destinada principalmente para a produção de lã, especialmente em estados como o Rio Grande do Sul (Viana e Silveira, 2009), além de carne e leite (Guimarães, 2006). A exploração comercial de ovinos era anteriormente restrita principalmente à região Nordeste, mas atualmente tem se destacado em todas as regiões do Brasil (Simplício, 2011). Em 2006, o efetivo ovino brasileiro foi estimado em 13.856.747 cabeças, sendo que 763.617 correspondiam ao rebanho da região Sudeste e 225.725 ao rebanho de Minas Gerais (Censo agropecuário, 2006). Contudo, o crescimento da ovinocultura do país não foi acompanhado por desenvolvimento sanitário, tecnológico e científico adequado, o que resulta em baixa produção (Guimarães, 2006; Simplício, 2011).

Brucella ovis é uma bactéria Gram negativo que infecta principalmente ovinos e causa uma doença conhecida como epididimite contagiosa ovina (Buddle e Boyes, 1953; Buddle, 1956). A doença afeta o sistema reprodutor e provoca diminuição da fertilidade dos carneiros e com menor frequência aborto em fêmeas gestantes (Biberstein et al., 1963; Meinershagen et al., 1974, Marco et al., 1994, Grilló et al., 1999; Carvalho Jr. et al., 2011). A principal consequência da doença é a diminuição da reprodução dos animais, o que afeta diretamente a produção da ovinocultura (Carpenter et al., 1987).

Além da *B. ovis*, o gênero *Brucella* é constituído por outras espécies com importância na saúde pública e animal. É conhecido que as bactérias desse gênero são capazes de subverter o sistema imunológico inato e assim sobreviver e multiplicar dentro do hospedeiro (Martirosyan et al., 2011). O sistema imunológico inato atua como a primeira defesa do hospedeiro ao reconhecer moléculas comuns a grupos de patógenos, ativar mecanismos efetores e direcionar a resposta imunológico adaptativa para eliminar o agente agressor (Abbas e Lichtman, 2005). Uma forma de reconhecimento dos patógenos ocorre por meio de receptores transmembrana chamados receptores semelhantes a *Toll* (TLR), que uma vez ativados iniciam uma cascata de sinalização

intracelular que resulta em ativação de genes pró-inflamatórios e produção de citocinas (Kawai e Akira, 2010).

A capacidade da *Brucella spp.* ativar uma resposta imunológica menos robusta quando comparada com outros patógenos é devido a moléculas específicas que são fracos ativadores dos receptores TLR, como exemplo, seu LPS não clássico considerado um agonista fraco de TLR4 (Martirosyan et al., 2011). Adicionalmente, foi descoberto que a *Brucella* produz uma proteína denominada TcpB que inibe diretamente a sinalização TLR2 e TLR4 por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008). Contudo, os dados presentes na literatura sobre a interação entre *Brucella spp.* e o sistema imunológico hospedeiro são baseados apenas em estudos com *B. melitensis* e *B. abortus* (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; Cirl et al., 2008) e não há conhecimento sobre como a *B. ovis* age para evadir as ações da imunidade do hospedeiro e persistir no organismo.

A *B. ovis* destaca-se dentro do gênero *Brucella* primeiramente por causar uma doença em carneiros que provoca infertilidade e conseqüentemente perdas financeiras para a ovinocultura (Carpenter et al., 1987); e segundo por possuir baixo potencial patogênico dentro de um gênero em que há espécies com elevado potencial para causar doenças, inclusive no homem. Dessa forma, o estudo desta bactéria pode representar uma nova forma de abordar e compreender quais seriam mecanismos de virulência utilizados ou perdidos pela *B. ovis* que resultaram em perda de patogenicidade (Tsolis et al., 2009).

Por isso, este trabalho teve como objetivo investigar a participação dos receptores TLR 2, 4 e 9 e da molécula adaptadora MyD88 na infecção por *B. ovis* utilizando-se o modelo murino de infecção e avaliar se a proteína TcpB atua como mecanismo de virulência da *B. ovis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brucelose

A brucelose é uma doença infecciosa que acomete animais domésticos e selvagens causada por bactérias do gênero *Brucella*, sendo o aborto uma das principais formas de manifestação clínica. A doença é considerada zoonótica e no homem é caracterizada por episódios de febre e outras complicações como acometimento osteoarticular e doença neurológica. A transmissão para o homem ocorre principalmente pela ingestão de produtos de origem animal como, por exemplo, derivados do leite não pasteurizado. Outra forma de transmissão é a inalação de aerossóis, comum em pessoas que trabalham em laboratórios com esta bactéria e por isso, a manipulação do agente deve ser realizada em laboratórios de biossegurança nível 3. A doença também é comum em profissionais como médicos veterinários, magarefes e funcionários de fazendas (WHO, 2006).

A primeira descrição deste patógeno foi feita pelo pesquisador David Bruce em 1887, que identificou a bactéria “*Micrococcus melitensis*” como agente da febre de Malta. Posteriormente, a bactéria foi isolada do leite de cabra, o que confirmou o caráter zoonótico da doença (Godfroid et al., 2005). Em seguida, as espécies *B. abortus* e *B. suis* foram identificadas como patógenos em bovinos e suínos, respectivamente (Banai e Corbel, 2010). A *B. ovis* foi a quarta espécie do gênero a ser identificada, como causa de epididimite em carneiros (Buddle, 1956). Atualmente o gênero possui seis espécies clássicas: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae* (Osterman e Moriyon, 2006), e outras três espécies identificadas: *B. microti*, *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, sendo que estas duas últimas foram isoladas de animais marinhos (Ewalt et al., 1994; Foster et al., 1996). Recentemente uma nova espécie foi isolada de um implante de seios de uma paciente com sinais de brucelose e foi denominada *B. inopinata* (Scholz et al., 2010). Adicionalmente, uma amostra bacteriana isolada de um anfíbio conhecido como *African bullfrog* (*Pyxicephalus edulis*) demonstrou semelhança genômica de 100% com a *B. inopinata* (Eiseberg et al., 2012). Contudo, os dados presentes na literatura são insuficientes para determinar o hospedeiro preferencial dessa espécie.

Acredita-se que as diferentes espécies evoluíram de um ancestral comum e que ao longo dessa evolução se adaptaram a determinados hospedeiros, de forma que cada espécie de *Brucella* possui predileção por um mamífero. Por exemplo, a *B. canis* tem como hospedeiro preferencial cães, a *B. suis* infecta preferencialmente suínos enquanto a *B. microti* tem como hospedeiro preferencial ratos silvestres (Moreno et al., 2002). Apesar da predileção por um hospedeiro, algumas espécies de *Brucella* podem infectar outros hospedeiros como, por exemplo, bovinos naturalmente infectados com *B. suis* biovar tipo 1 (Ewalt et al., 1997). As espécies de *Brucella* e seus hospedeiros preferenciais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Espécies de *Brucella* e seus hospedeiros preferenciais

Espécie	Hospedeiro Preferencial
<i>B. abortus</i>	Bovinos
<i>B. suis</i>	Suínos, lebres, renas e ratos selvagens
<i>B. melitensis</i>	Ovinos e caprinos
<i>B. ovis</i>	Ovinos
<i>B. neotomae</i>	Rato selvagem
<i>B. canis</i>	Cães
<i>B. ceti</i>	Cetáceos
<i>B. pinnipidialis</i>	Pinípedes
<i>B. microti</i>	Rato Silvestre
<i>B. inopinata</i>	Desconhecido

Fonte: Adaptada de Banai e Corbel, 2010

Ademais, algumas espécies de *Brucella* causam doença no homem e há diferenças em relação ao potencial zoonótico. *B. melitensis* e *B. suis* possuem elevado potencial patogênico seguidos por *B. abortus*, com potencial patogênico moderado para humanos e *B. canis* com baixo potencial zoonótico (WHO, 2006). Casos de brucelose humana causada por espécies marinhas de *Brucella sp* também já foram descritos (Brew et al., 1999, Sohn et al., 2003). Já outras espécies como *B. ovis*, *B. microti* e *B. neotomae* não possuem potencial zoonótico comprovado (WHO, 2006).

A diferença entre as espécies de *Brucella* em relação ao hospedeiro preferencial e patogenicidade no homem pode ser devido a diferenças no genoma, embora bactérias do gênero possuam elevada conservação genômica entre elas (por exemplo, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* possuem semelhança de nucleotídeos maior que 94%) (Chain et al., 2005). Contudo, observou-se que há diferenças em relação ao número de pseudogenes, ou seja, genes inativados, sendo que a *B. ovis* possui maior número de genes inativados (244 no total) seguida por *B. abortus* (207 pseudogenes), *B. melitensis* (152 pseudogenes) e *B. suis* (82 pseudogenes). É interessante notar que a *B. ovis*, espécie sem potencial zoonótico, possui o maior número de pseudogenes. Da mesma forma, a *B. abortus*, que possui moderada capacidade de infectar humanos, tem maior número de genes inativados quando comparada com as espécies mais patogênicas (Chain et al., 2005, Tsolis et al., 2009).

Acredita-se que a diferença no número e distribuição de pseudogenes seja a causa da diferença de virulência e especificidade entre as espécies de *Brucella*. Grande parte dos pseudogenes está relacionada a genes que codificam moléculas estruturais de membrana e de transporte, que pode auxiliar a bactéria a se estabelecer no ambiente intracelular (Chain et al., 2005). Em contrapartida, fatores de virulência conhecidos da *Brucella* como o sistema de secreção tipo IV (T4SS) estão conservados entre as espécies do gênero (Chain et al., 2005; Tsolis et al., 2009).

2.2 *Brucella ovis*

A infecção por *B. ovis* causa uma doença em carneiros denominada epididimite contagiosa ovina, embora outros agentes bacterianos possam também causar epididimite em carneiros. A infecção foi descrita pela primeira vez em ovinos na Nova Zelândia em 1953 (Buddle e Boyes, 1953) e posteriormente foi proposto como uma nova espécie de *Brucella* em 1956 (Buddle, 1956). As fêmeas também podem apresentar a doença caracterizada principalmente por endometrite e com menor frequência, abortos e mortalidade de neonatos (Collier e Molello, 1964; Meinershagen et al., 1974; Marco et al.; 1994, Grilló et al., 1999).

A infecção por *Brucella ovis* possui distribuição mundial, incluindo o Brasil, onde inquéritos sorológicos e detecção da bactéria no sêmen demonstram evidências da

doença em alguns estados brasileiros como, Piauí (Costa et al, no prelo), Bahia (Silva et al, 2009), Minas Gerais (Marques, 2006), Rio Grande do Norte (Silva et al, 2003, Azevedo et al, 2004) e Rio Grande do Sul (Magalhães Neto e Gil-Turnes, 1996).

Em relação à estudos sobre brucelose ovina, Biberstein et al. (1963) observaram, em infecção experimental em carneiros, que após a inoculação por via conjuntival a bactéria é detectada por dois meses nos linfonodos regionais e sangue. Em seguida, foi observado colonização da bactéria no trato genital, principalmente cabeça do epidídimo, mas também em outros órgãos como fígado, rins e baço, onde a *B. ovis* se estabelece de forma permanente (Biberstein et al., 1963). Os dados desse estudo foram baseados em análise bacteriológica de fragmentos de órgãos coletados dos animais infectados em diferentes períodos de tempo durante 255 dias, com intervalos entre as coletas de 7 dias no primeiro mês e posteriormente intervalos de 15 dias até o final do experimento (Biberstein et al., 1963).

Recentemente, Xavier et al. (2010) realizou infecção experimental com *B. ovis* em carneiros pelas vias intraconjuntival e intraprepucial e, além de bacteriologia realizou a reação em cadeia da polimerase (PCR) como método diagnóstico. Ao contrário do observado no primeiro estudo experimental, Xavier et al. (2010) não detectaram *B. ovis* em sangue em nenhum tempo de infecção, que variou entre 0 e 180 dias, e também não observaram bactéria em amostras de baço e rim. Nesse estudo, a *B. ovis* começou a ser detectada em fluídos corporais a partir de 30 dias pós infecção (dpi) em urina e depois de 45 dpi também foi identificada em sêmen e lavado prepucial. Em tecidos, foi observada maior colonização em órgãos do trato genital, principalmente vesícula seminal e cauda do epidídimo, mas também foi detectada em linfonodos ilíacos, fígado e bexiga (Xavier et al., 2010).

A doença pode ser identificada durante o exame clínico do animal, principalmente por palpação (Hughes e Claxton, 1968) e os sinais clínicos incluem: aumento de volume e consistência da cabeça do epidídimo, que pode ser uni ou bilateral, diminuição da circunferência escrotal e em casos mais acentuados, em que há formação de granuloma espermático, nódulos podem ser notados. Contudo, tais sinais não são específicos para a infecção por *B. ovis* e apenas métodos clínicos são insuficientes para diagnóstico definitivo (Hughes e Claxton, 1968, Carvalho Júnior et al., 2011).

As lesões microscópicas nos machos são identificadas principalmente na cauda do epidídimo, onde observa-se hiperplasia do epitélio epididimário, por vezes com formação de cistos intraepiteliais, acompanhada por infiltrado inflamatório neutrofilico. A alteração no epitélio epididimário pode acarretar em rompimento e extravasamento de espermatozóides para o interstício com conseqüente formação de granuloma espermático (Biberstein et al., 1963). Ampola e vesícula seminal podem apresentar lesões inflamatórias com predomínio de linfócitos e plasmócitos (Carvalho Júnior et al., 2011).

As lesões no epidídimo são responsáveis por alterações espermáticas que resultam em infertilidade. As principais alterações observadas nos espermatozóides são: diminuição da motilidade, cabeças livres e alterações na cauda, como caudas dobradas (Cameron e Lauerman, 1976, Carvalho Júnior et al., 2011). O ejaculado dos animais também pode conter células inflamatórias, principalmente neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Carvalho Júnior et al., 2011).

Em fêmeas, *B. ovis* apresenta menor patogenicidade quando comparada com outras espécies de *Brucella* (Collier e Molello, 1964). As ovelhas gestantes infectadas com *B. ovis* podem apresentar principalmente endometrite, descrita como infiltrado inflamatório periglandular predominantemente mononuclear (linfócitos, plasmócitos e macrófagos), por vezes com alguns neutrófilos no lúmen das glândulas endometriais e hiperplasia epitelial (Marco et al., 1994, Grilló et al., 1999). Além do útero, infecções experimentais em fêmeas demonstraram que a bactéria pode persistir em linfonodos, baço e glândula mamária, inclusive com eliminação da bactéria pelo leite (Grilló et al., 1999).

O abortamento não é uma conseqüência marcante da infecção por *B. ovis* (Collier e Molello, 1964, Muhammed et al., 1975, Grilló et al., 1999), ao contrário da infecção de ovelhas por *B. abortus* e especialmente *B. melitensis* (Collier e Molello, 1964). Contudo, casos de abortos causados pela infecção natural ou experimental por *B. ovis* já foram relatados. Desta forma, a infecção por esta bactéria deve ser considerada em rebanhos ovinos em que há animais infectados com perda fetal (Molello et al., 1963, Meinershagen et al., 1974, Libal e Kirkibride, 1983). Em alguns casos, é possível

observar lesão placentária, como exsudato purulento na região intercotiledonária (Collier e Molello, 1964, Libal e Kirkibride, 1983). Essa lesão na placenta pode resultar em má nutrição do feto e, conseqüentemente nascimento de filhotes fracos (Burgess et al., 1982).

A transmissão da doença ocorre principalmente pelo contato sexual de carneiros com fêmeas que copularam no mesmo estro com machos infectados e pelo contato de mucosas com secreções no pasto como urina e sêmen infectados. O comportamento homossexual entre machos também é considerada uma forma de transmissão (Burgess et al., 1982, Marco et al., 1994). Apesar da eliminação de *B. ovis* pelo leite, não há transmissão para os filhotes por ingestão de leite contaminado (Grilló et al., 1999).

Métodos laboratoriais de diagnóstico como sorologia (especialmente IDGA e fixação por complemento), bacteriologia e PCR são utilizados para confirmação da infecção (Burgess et al., 1982, Xavier et al., 2010). A bactéria é eliminada para o ambiente pelo sêmen e urina de forma intermitente (Hughes e Claxton, 1968, Burgess et al., 1982, Xavier et al., 2010). Dessa forma, amostras desses fluidos e adicionalmente, lavado prepucial, podem ser utilizados para exames bacteriológicos e PCR para detecção do agente (Xavier et al., 2010).

O controle da doença é realizado pela eliminação dos animais acometidos do rebanho. Em países onde é permitida a vacinação dos animais com Rev1 (vacina atenuada contra *B. melitensis*) bons resultados tem sido obtidos para a prevenção da infecção por *B. ovis*. Contudo, em países livres de *B. melitensis* a vacina não pode ser utilizada como é caso do Brasil (Santos et al., 2005).

2.3 Patogênese e fatores de virulência de *Brucella* spp

A virulência de uma bactéria é definida pela sua capacidade de infectar o hospedeiro e causar lesão. Para isso, os patógenos devem ser capazes penetrar no hospedeiro, evadir as respostas imunológicas e promover um ambiente adequado para multiplicação, sendo necessário a expressão de fatores de virulência (Gyles e Prescott, 2008). As bactérias do gênero *Brucella* são desprovidas de fatores de virulência clássicos, como fímbrias e plasmídeos, mas possuem outros mecanismos que as permitem subverter a resposta do

sistema imunológico inato e sobreviver no ambiente intracelular, inclusive em macrófagos (Martirosyan et al., 2011).

As bactérias Gram negativo possuem em sua membrana externa uma molécula chamada de lipopolissacarídeo (LPS), cuja função é promover integridade do micro-organismo ao funcionar como uma barreira. É composto por uma porção que se liga à membrana externa da bactéria chamada Lipídio A, uma parte central de oligossacarídeos e uma porção externa chamada Cadeia O. A característica rugosa ou lisa das bactérias é determinada pela natureza de seu LPS: as rugosas não possuem cadeia O (Ruiz et al., 2009). O LPS da *Brucella* é distinto do LPS de outras bactérias Gram negativo devido a alterações moleculares em seus componentes. O lipídio A da *Brucella* possui uma estrutura de diaminoglicose ao invés de glucosamina, como observado em bactérias como *E. coli*, além de cadeias de ácidos graxos mais longas (Lapaque et al., 2005).

O LPS da *Brucella* atua como um fator de virulência, devido sua baixa endotoxicidade, capacidade de resistir a peptídeos antimicrobianos e ação do complemento, baixa estimulação do sistema imunológico inato e participação em fases iniciais da formação vacúolo intracelular contendo *Brucella* (BCV) (Martinez de Tejada et al., 1995, Freer et al., 1996, Allen et al., 1998, Porte et al., 2003, Lapaque et al., 2005). Acredita-se que a cadeia O possua papel essencial na virulência da *Brucella*, visto que mutantes rugosos de *B. abortus* e *B. melitensis* (que são espécies com LPS liso) são atenuados no modelo murino e *in vitro* (Godfroid et al., 1998, Hong et al., 2000, Bagués et al., 2004; Lacerda et al., 2010). Além disso, mutantes rugosos também são mais susceptíveis a peptídeos antimicrobianos e ação do complemento (Martinez de Tejada et al., 1995, Allen et al., 1998). Contudo, as espécies de *Brucella* que naturalmente não possuem cadeia O, *B. ovis* e *B. canis*, são patogênicas para seus respectivos hospedeiros e capazes de resistir à ação do complemento (Allen et al., 1998, Silva et al., 2011a, Sá et al., 2012).

A resistência conferida pelo LPS permite que a *Brucella* sobreviva no meio extracelular antes de colonizar e multiplicar no citoplasma das células. Os mecanismos de internalização da *Brucella* ainda não são totalmente conhecidos, mas alguns estudos sugerem que a bactéria alcance o ambiente intracelular após interação com plataformas lipídicas (*lipid rafts*) (Watarai et al., 2002, Kim et al., 2004, Martín-Martín et al., 2010). Estas são porções da membrana plasmática da célula do hospedeiro e de fagossomos

compostas predominantemente por colesterol e glicofosfolípidios, como GM₁ (Shin e Abraham, 2001). Estudos com espécies lisas e rugosas de *Brucella*, inclusive *B. ovis*, demonstraram associação dos componentes da plataforma lipídica com o BCV (Watarai et al., 2002; Naroeni e Porte et al., 2002; Kim et al., 2004; Martín-Martín et al., 2010).

Após a internalização, o BCV escapa da fusão com o lisossomo e se funde com o retículo endoplasmático, o qual é o nicho replicativo da *Brucella* (Pizarro-Cerdá et al., 1998; Celli et al., 2003). O sistema de secreção de dois componentes BvrS / BvrR (*Brucella virulence related*), cuja função é detectar alterações ambientais e responder com modulação gênica para que haja adaptação, é um fator de virulência necessário para que a *Brucella* seja capaz de entrar na célula e evitar a fusão com o lisossomo. Mutantes de *B. abortus* com deleção dos genes que codificam esse sistema são atenuados no modelo murino e em culturas celulares, por apresentarem baixa eficiência de invasão e fusão com o lisossomo. Dessa forma, este fator é essencial para invasão e sobrevivência intracelular (Sola-Landa et al., 1998). O gene que codifica o BvrS / BvrR é conservado em *B. ovis* (Tsolis et al., 2009), contudo em um estudo com essa bactéria não foi possível gerar mutantes com deleção desse gene (Martín-Martín et al., 2012).

A não fusão do BCV com o lisossomo é um ponto crucial para o sucesso da infecção por influenciar a sobrevivência intracelular da *Brucella*. Uma molécula presente no espaço periplasmático denominada Glucan β -cíclico (c β g) exerce função essencial para a *Brucella*, uma vez que é requerida para evitar a fusão com o lisossomo. Essa molécula possui características químicas que a permitem interagir com as plataformas lipídicas e há uma hipótese sobre a possibilidade do c β g eliminar o colesterol dessas estruturas de membrana do hospedeiro e assim alterar as propriedades químicas dos vacúolos evitando sua fusão com o lisossomo (Arellano-Reynoso et al., 2005). A ausência do gene que codifica a enzima que sintetiza o c β g acarreta em fenótipo atenuado da bactéria em infecção *in vitro* e no modelo murino (Briones et al., 2001; Arellano-Reynoso et al., 2005). A atenuação ocorre por falhas na multiplicação e incapacidade de evitar a fusão com o lisossomo (Arellano-Reynoso et al., 2005). Além disso, a amostra de *B. abortus* deficiente em c β g apresenta redução da virulência em camundongos (Briones et al., 2001). Um estudo recente em *B. ovis* também demonstrou a importância do c β g na virulência desta espécie de *Brucella*. A amostra mutante de *B. ovis* deficiente em c β g também apresentou atenuação: em células da linhagem J774.1 apresentou

menor internalização *in vitro* e menor colonização esplênica em camundongos após 3 semanas de infecção quando comparada com a *B. ovis* selvagem (Martín-Martín et al., 2012).

Outro importante fator de virulência relacionado com sobrevivência intracelular é o sistema de secreção tipo 4 (T4SS), codificado pelo operon *virB* constituído por 12 genes (Hong et al., 2000). O T4SS é um sistema de secreção pelo qual a bactéria é capaz de secretar proteínas efetoras diretamente para as células alvo (Juhás et al., 2008). A participação das proteínas codificadas pelo operon *virB* durante o trânsito intracelular da *Brucella* é bem estabelecida. A expressão de genes do operon *virB* ocorre em ambiente intracelular e depende da acidificação do BCV e amostras mutantes para alguns destes genes são incapazes de multiplicar *in vitro*. (Boschioli et al., 2002; Celli et al., 2003). Celli et al. (2003) observaram que na ausência de um T4SS funcional a *B. abortus* não consegue se multiplicar e a partir de cinco horas pós-infecção (hpi) a quantidade de bactéria intracelular diminui. Comportamento semelhante foi observado em amostras mutantes de *B. suis* que não foram capazes de multiplicar em células THP1 (linhagem de célula semelhante a monócitos humanos) a partir de 24 horas (Boschioli et al., 2002).

Hong et al. (2000) descrevem que em camundongos o T4SS é necessário apenas para a persistência de *B. abortus* no hospedeiro, o que foi confirmado em seguida com a cinética de infecção de *B. abortus* Δ *virB*. Rolán e Tsolis (2007) demonstraram que esse mutante é capaz de colonizar o baço de camundongos em tempos iniciais de infecção (3 a 5 dias). Estes dados corroboram com Den Hartigh et al. (2004), que observaram diminuição da colonização bacteriana em baço de camundongos apenas a partir de 3 semanas.

Amostra mutante de *B. ovis* com deleção do gene *virB2* é atenuada no modelo murino, desde um dpi pois não é capaz de estabelecer infecção. Em modelo murino de infecção intraperitoneal a bactéria não sobrevive no meio extra e intracelular em macrófagos peritoneais. Isso indica que para esta espécie de *Brucella* um T4SS funcional é requerido não apenas para multiplicação intracelular e persistência, mas também para estabelecimento da infecção (Sá et al., 2012). O comportamento *in vitro* também é afetado pela ausência de T4SS em *B. ovis*. Estudo com macrófagos murinos RAW

264.7 demonstrou que a *B. ovis* $\Delta virB2$ não consegue multiplicar no interior celular, assim como *B. abortus* $\Delta virB$, e a diminuição da carga bacteriana intracelular começa às 24 hpi (Sá et al., 2012). Ausência de multiplicação bacteriana em amostras *B. ovis* $\Delta virB2$, com redução da colonização intracelular a partir de 20 hpi também foi demonstrado em macrófagos murinos da linhagem J774.A1 (Martín-Martín et al., 2012).

B. ovis apresenta um sistema ABC transportador (*ATP binding transporter*), ausente nas demais espécies clássicas de *Brucella*, essencial para o estabelecimento da infecção em camundongos (Silva et al., 2011a). ABC transportadores, presentes em diversos organismos, são estruturas transmembranas e com domínios citosólicos cuja função é importar e/ou exportar moléculas, por exemplo nutrientes, ativamente por meio da hidrólise do ATP. Muitas vezes o ABC transportador atua como fator de virulência uma vez que pode atuar na secreção de toxinas ou importação de moléculas fundamentais para a sobrevivência bacteriana (Davidson et al., 2008). Amostra de *B. ovis* com deleção do gene que codifica parte do sistema ABC transportador não consegue estabelecer infecção em modelo murino desde o primeiro dpi e embora consiga invadir, não sobrevive no interior de macrófagos peritoneais ou macrófagos RAW 264.7 (Silva et al., 2011a).

A transmissão da *Brucella* no homem e nos animais pode ocorrer por ingestão de produtos animais contaminados (WHO, 2006). Em camundongos, foi demonstrado que para que haja infecção por via oral é necessário que *Brucella* produza urease (Bandara et al., 2007; Sangari et al., 2007; Paixão et al., 2009), uma enzima envolvida na hidrólise da uréia em amônia e ácido carbônico (Burne e Chen, 2000). Sugere-se que essa reação cause elevação do pH do ambiente, permitindo a bactéria sobreviver ao ambiente ácido do trato gastrointestinal (Bandara et al., 2007).

As amostras mutantes para urease de *B. abortus* e *B. suis* não são atenuadas em camundongos infectados por via intraperitoneal e nem em macrófagos quando comparados com a amostra virulenta (Bandara et al., 2007; Sangari et al., 2007). Entretanto, quando a infecção ocorre por via oral os mutantes de *B. suis* e *B. melitensis* não são capazes de causar infecção persistente (Bandara et al., 2007; Sangari et al., 2007; Paixão et al., 2009). Esses dados demonstram que a urease é necessária para

estabelecer infecção via trato gastrointestinal, mas não é necessária para a sobrevivência intracelular da *Brucella* (Sangari et al., 2007).

A *B. ovis* é a única bactéria urease negativa dentre as bactérias do gênero (Corbel e Hendry, 1985). A falta de produção da enzima é justificada pela presença de diversas mutações pontuais no gene que codifica a urease (*ureI*) (Tsolis et al., 2009). Dessa forma, hipotetiza-se a incapacidade de *B. ovis* infectar o homem por via oral devido a falta desse fator de virulência (Sangari et al., 2007; Tsolis et al., 2009).

2.4 Mecanismos de evasão do sistema imunológico do gênero *Brucella*

Uma importante característica da infecção por *Brucella* é a capacidade que a bactéria possui de subverter a resposta do sistema imunológico inato (Martirosyan et al., 2011). Esse sistema é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de patógenos e é constituído por barreiras epiteliais, células *natural killer*, células fagocitárias tais como neutrófilos e macrófagos, e proteínas do sistema do complemento (Abbas e Lichtman, 2005). O reconhecimento celular de agentes agressores é mediado por receptores como receptores semelhantes a *toll* (TLR), presentes na membrana extracelular, na membrana do retículo endoplasmático e de compartimentos endossomais. Os TLR estão presentes em células do sistema imunológico como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, mas também em outros tipos celulares como células epiteliais, fibroblastos e neurônios (Moresco et al., 2011).

Os TLR reconhecem moléculas presentes e comuns a grupos de patógenos, que são denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). O reconhecimento de um PAMP por um TLR é um passo importante da imunidade inata, pois a ativação destes receptores gera transcrição de genes pró-inflamatórios e citocinas que darão início aos mecanismos de defesa efetores associados à inflamação, e direcionarão a resposta imunológica adaptativa adequada ao agente agressor (Moresco et al., 2011).

Os TLR são receptores de membranas que possuem uma porção externa, responsável pelo reconhecimento do patógeno, uma porção transmembrânica e uma porção interna composta por um domínio TIR (do inglês *Toll-interleucina 1*) que possui a função de

iniciar a cascata intracelular de sinalização. Os eventos intracelulares são mediados por moléculas adaptadoras que também possuem domínios TIR, como por exemplo, *Myeloid differentiation primary response gene* (MyD88), *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) e *TIR domain containing adaptor protein* (TIRAP). Dessa forma, a ligação entre os TLR e as moléculas adaptadoras ocorre entre esses domínios. Em seguida, dependendo da molécula adaptadora acoplada a porção TIR do TLR, ocorre a ativação dos fatores de transcrição como *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), *activator protein 1* (AP-1) ou *Interferon regulatory factor 3* (IRF-3), que irão modular a transcrição de genes pró-inflamatórios e produção de citocinas (Vasselon e Detmers, 2002; Kawai e Akira, 2010).

Os TLR têm sido identificados em diversas espécies animais. Em camundongos são conhecidos doze TLR sendo que 9 receptores são conservados entre essa espécie e ovinos, incluindo o TLR7, o mais conservado entre as espécies, com 81% de similaridade e o TLR 2 e TLR4, com menor similaridade, ambos com 72% (Chang et al., 2009). O TLR10 foi descrito no homem e ovinos (Chang et al., 2009), mas não está presente em camundongos (Hasan et al., 2005). Cada TLR possui a capacidade de reconhecer um grupo de moléculas específico dos microrganismos como resumido na tabela 2 (Watters et al., 2007; Kawai e Akira, 2010).

Tabela 2: Função, localização e molécula adaptadora dos TLR.

Receptor	Localização	PAMP	Molécula adaptadora
TLR1	Superfície celular	Lipopeptídeos triacilados	TIRAP, MyD88
TLR2	Superfície celular	Lipopeptídeos, peptideoglicanos, zymosan, ácido lipotecóico,	TIRAP, MyD88
TLR3	Intracelular	RNA de fita dupla	TRIF
TLR4	Superfície celular	LPS	TIRAP, MyD88
TLR5	Superfície celular	Flagelina	MyD88
TLR6	Superfície celular	Lipopeptídeos diacilados	TIRAP, MyD88
TLR7	Intracelular	RNA de fita simples	MyD88
TLR8	Intracelular	RNA de fita simples	MyD88

TLR9	Intracelular	DNA	MyD88
TLR10	Superfície celular	Não conhecido	MyD88

Fonte: Watters et al., 2007; Kawai e Akira, 2010.

O reconhecimento de componentes da *Brucella* pelos TLR tem sido alvo de estudo, principalmente nas espécies *B. abortus* e *B. melitensis* (Campos et al., 2004; Huang et al., 2005; Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007; Macedo et al., 2008). Sabe-se que estas espécies possuem a capacidade de evitar a ativação dos TLR ao modificar seus PAMP e também por um mecanismo ativo de inibição da via de sinalização TLR (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008).

A capacidade da *Brucella* de subverter a resposta imunológico inata em parte se deve às características distintas de seus componentes de membrana, como por exemplo seu LPS não clássico. O LPS da *Brucella* possui baixa capacidade de ativar a resposta imunológico e gerar resposta endotoxêmica. Estudos comparativos com outras bactérias Gram negativo demonstraram que o LPS liso da *B. abortus* induz menores níveis de fator de necrose tumoral - α (TNF- α) (Lapaque et al., 2006) e que camundongos infectados não apresentaram sinais relacionados com sepse, como por exemplo desordens coagulativas e leucocitose (Barquero-Calvo et al., 2007).

Um mecanismo ativo de inibição da sinalização TLR mediado por proteína de *Brucella*, denominada Btp1 (*Brucella Tir protein 1*) em *B. abortus* (Salcedo et al., 2008) e TcpB (*Brucella Tir containing protein*) em *B. melitensis* (Cirl et al., 2008) tem sido estudado. Esta proteína possui um domínio semelhante ao domínio TIR presente na porção interna dos receptores TLR e em suas moléculas adaptadoras (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008) e é capaz de inibir a via de sinalização do TLR2 e TLR4 (Salcedo et al., 2008; Sengupta et al., 2010) e conseqüentemente inibir a maturação de células dendríticas e o desencadeamento de resposta imunológica eficiente (Salcedo et al., 2008). Entretanto, infecção *in vitro* e *in vivo* com amostras mutantes de *B. melitensis* e *B. abortus* deficientes em TcpB demonstraram que não há influência desta molécula em sobrevivência e multiplicação em macrófagos e nem na colonização esplênica em camundongos (Radhakrishnan et al., 2009; Sengupta et al., 2010).

O mecanismo exato de ação da TcpB sobre a via de sinalização dos TLR's ainda necessita ser esclarecido. Acredita-se que haja interação dessa proteína com a molécula adaptadora TIRAP, que é responsável por recrutar o MyD88 nas vias de sinalização dos receptores TLR2 e TLR4 (Radhakrishnan et al., 2009; Sengupta et al., 2010). Sengupta et al. (2010) sugerem que a TcpB causa degradação do TIRAP por meio de ubiquitinação. Seu estudo demonstrou que macrófagos infectados com a amostra virulenta de *B. abortus* apresentaram redução dessa molécula em sua forma fosforilada, enquanto que em macrófagos infectados com *B. abortus* $\Delta tcpB$ não houve redução significativa do TIRAP fosforilado (Sengupta et al., 2010).

Alguns estudos demonstraram que além da interação com o TIRAP, a TcpB também interage com os microtúbulos das células do hospedeiro, que são estruturas do citoesqueleto envolvidas em diversos processos celulares, inclusive sinalização intracelular. Radhakrishnan et al. (2009) demonstraram co-localização da TcpB com os microtúbulos e posteriormente observaram que essa proteína aumenta a polimerização dos microtúbulos (Radhakrishnan et al., 2011). Esses autores hipotetizaram que este fenômeno com os microtúbulos poderia facilitar a ativação do processo de ubiquitinação que culmina com degradação do TIRAP (Radhakrishnan et al., 2011).

Outro estudo indica que TcpB interage com porção da molécula do MyD88 denominada domínio da morte sem promover homodimerização da molécula adaptadora (Chaudhary et al., 2012). O domínio da morte é relacionado a interação entre proteínas que contenham essa porção, e essas interações são necessárias para induzir a ativação de cascatas celulares que culminam na ativação de fatores de transcrição (Burns et al., 1998).

Com os mecanismos acima descritos, a *Brucella* tem potencial de evitar o reconhecimento inicial pelo sistema imunológico do hospedeiro via TLR's e este fenômeno tem sido investigado em modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* por *Brucella*. Weiss et al. (2005) e Barquero-Calvo et al (2007) não observaram maior susceptibilidade de animais TLR4 *knockout* (TLR4 $-/-$) à infecção por *B. abortus*, visto que o curso da infecção nestes animais foi semelhante aos camundongos selvagens. Contudo, observaram *in vitro* que a produção de TNF- α por macrófagos é dependente de TLR4 (Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007). Por outro lado, Campos et

al. (2004) demonstraram que camundongos da linhagem C3H/HeJ (animais naturalmente deficientes em TLR4) apresentaram maior contagem bacteriana de *B. abortus* em baço quando comparados com animais com TLR4 funcional, o que indica que sem esse receptor, os animais foram mais susceptíveis à infecção. Adicionalmente, nesse estudo foi observada menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e Interleucina-12 (IL-12), por macrófagos e Interferon-gamma (IFN- γ) em esplenócitos de animais TLR4 $-/-$ infectados com *B. abortus*, o que poderia justificar a maior susceptibilidade à infecção (Campos et al., 2004).

Diferente da controvérsia observada em relação à importância do TLR4 durante infecção, é bem estabelecido que o TLR2 não é essencial para o controle da infecção de *B. abortus* em camundongos, considerando que camundongos TLR2 $-/-$ apresentaram contagem bacteriana em baço e em macrófagos semelhante a animais selvagens (Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007). Interessantemente, a produção de TNF- α após a estimulação *in vivo* e *in vitro* com a *B. abortus* inativada pelo calor (*Heat Killed B. abortus* – HKBA), ou seja com PAMP de *Brucella*, é dependente de TLR2 (Huang et al. 2003).

Uma maior susceptibilidade de camundongos TLR9 $-/-$ e MyD88 $-/-$ à infecção por *B. abortus*, caracterizada por maior recuperação bacteriana no baço desses animais, foi claramente demonstrada (Macedo et al., 2008). Além disso, Huang et al. (2005) observaram que HKBA induz a produção de IL-12p40 e esta é parcialmente dependente de TLR9 e MyD88 em células dendríticas. Como o MyD88 também participa da sinalização intracelular de outros receptores como IL-1 e IL-18, Weiss et al. (2005) realizaram experimentos com animais *knockout* para tais receptores e observaram que a ausência deles não interfere no curso da infecção, e que portanto, as observações feitas em animais MyD88 $-/-$ são consequentes da interferência na via de sinalização TLR. Juntos, esses dados indicam que o receptor TLR9 e a molécula adaptadora MyD88 desempenham função importante no reconhecimento e desenvolvimento de resposta efetora importante no controle da infecção por *B. abortus* em camundongos

Esta característica silenciosa permite que a *Brucella* ao entrar na célula do hospedeiro e, assim consiga atingir seu nicho replicativo (Martirosyan et al. 2011). Uma vez que a bactéria se localiza no retículo endoplasmático da célula, a ativação do macrófago ou

célula dendrítica não inibe o crescimento intracelular da bactéria (Barquero-Calvo et al., 2007; Salcedo et al., 2008). Adicionalmente, em modelo de infecção oral observou-se que a *B. melitensis* invade o organismo sem provocar resposta inflamatória no intestino (Paixão et al., 2009).

Não há dados disponíveis na literatura sobre o envolvimento dos TLR na sinalização e controle de infecção por *B. ovis*, bem como, o papel da proteína homóloga ao TIR (TcpB) de *B. ovis*. Por isso, estudos sobre o papel desses receptores e mecanismos de virulência da *B. ovis* são essenciais para o entendimento da patogênese da doença e conseqüentemente para o desenvolvimento futuro de métodos para controle e erradicação da doença.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar em modelo murino o papel dos TLR na infecção por *B. ovis* através dos objetivos específicos abaixo:

- i. Determinar a participação dos receptores TLR2, TLR4, TLR9 e molécula de adaptação MyD88 no controle da infecção por *B. ovis* em camundongos através da contagem bacteriana no baço de animais C57/BL6 e *knockout* para estes componentes.
- ii. Avaliar a indução da inflamação e resposta imunológico adaptativa contra *B. ovis* em baço de camundongos deficientes para receptores TLR2, TLR4, TLR9 e MyD88 através mensuração da transcrição de RNA mensageiros de genes potencialmente envolvidos.
- iii. Avaliar a participação de proteína homóloga ao TIR na virulência da *B. ovis* em camundongos ao comparar contagem bacteriana no baço de animais C57/BL6 infectados com a *B. ovis* amostra virulenta e/ou amostra para mutante para TcpB.

4. CAPÍTULO I

Participação dos receptores TLR2, TLR4, TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 durante infecção por *B. ovis* em camundongos C57/BL6

4.1 Introdução

A resposta imunológico inata por meio dos receptores TLR promove a linha inicial de defesa do hospedeiro a patógenos. Por meio de cascatas intracelulares de sinalização, ocorre ativação de fatores de transcrição que culminam em mecanismos efetores, principalmente pró-inflamatórios. Dentre os mecanismos efetores cita-se: aumento da permeabilidade vascular, produção de peptídeos antimicrobianos, aumento da função fagocítica, produção de citocinas, produção de espécies reativas de oxigênio, inibição da apoptose de neutrófilos, entre outros (Moresco et al., 2011; Prince et al., 2011).

Devido a escassez de trabalhos sobre como o hospedeiro reconhece e responde contra *B. ovis*, resolveu-se investigar por quais receptores TLR que estão envolvidos em reconhecimento bacteriano ocorre essa interação. Portanto, neste capítulo estudou-se a importância das vias de sinalização TLR2, TLR4, TLR9 e MyD88, por meio de infecção de camundongos *knockout*.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Amostras bacterianas e condições de cultura

Para este trabalho foram utilizadas amostras de *B. ovis* selvagem ATCC 25840 (WT). As amostras bacterianas foram cultivadas em meio de ágar tríptico de soja (TSA) com 10% de hemoglobina em estufa à 37° C e 5% de CO₂. Todos os procedimentos de manipulação com bactérias foram realizadas em laboratório de biossegurança nível 3.

Para a preparação do inóculo, as colônias bacterianas foram retiradas das placas de cultivo após três dias de crescimento e as colônias bacterianas diluídas em tampão fosfato-salino (PBS). A concentração bacteriana foi determinada por leitura em

espectrofotômetro (Biorad, EUA) em densidade óptica (OD) de 600nm. A concentração final do inóculo foi de aproximadamente 1×10^6 unidades formadoras de colônia/ml (UFC/mL). O inóculo foi posteriormente plaqueado em placas com TSA com hemoglobina para confirmação da concentração final.

4.2.2 Infecção animal

Inicialmente, foi realizada cinética de infecção de camundongos machos e fêmeas C57/BL6, a fim de avaliar se o sexo influencia o curso da infecção por *B. ovis*. Foram utilizados quatro camundongos machos e cinco camundongos fêmeas, com idades entre 6 e 7 semanas. Os animais foram infectados com aproximadamente 1×10^6 UFC/ml de *B. ovis* por via intraperitoneal e submetidos a eutanásia após, um, sete e 30 dpi com sobredose de quetamina e xilazina. Após a eutanásia, a necropsia foi realizada e amostras para exame bacteriológico e histopatológico foram coletadas.

Foram utilizados camundongos C57/BL6 *knockout* para TLR2 (n=8), TLR4 (n=9), TLR9 (n=5) e Myd88 (n=10) que foram gentilmente cedidos pelo Prof. Sérgio Costa de Oliveira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG) e pelo Prof. Ricardo Gazzinelli (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG). Camundongos C57/BL6 selvagens (*wild-type* -WT) utilizados como controle foram obtidos do CEBIO da UFMG em igual número ao grupo de camundongos *knockout* correspondente. Devido à dificuldade de criação, foram utilizados animais machos e fêmeas com idade entre oito e 15 semanas. Os animais *knockout* foram criados em condições *germ free*: micro-isoladores (Alesco, Brasil) com maravalha autoclavada e água e ração comercial para camundongos também autoclavadas.

Os animais foram infectados com aproximadamente 1×10^6 UFC/animal de *B. ovis* via intraperitoneal e submetidos a eutanásia após sete dpi com sobredose de quetamina e xilazina. Grupos de animais *knockout* que apresentaram diferença de colonização aos sete dpi foram também infectados com *B. ovis* por 30 dias. A necropsia dos animais foi realizada em seguida e foram coletadas amostras de baço e fígado para bacteriologia, histopatologia e imunoistoquímica. Amostras de baço também foram coletadas para avaliação do número de cópias de RNA.

Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA, protocolo 136/08).

4.2.3 Bacteriologia

Amostras de baço e fígado foram coletadas de forma asséptica, pesados e acondicionados em tubos cônicos de 50 ml contendo 2 ml de PBS estéril. Os fragmentos foram macerados com homegeneizador (Hamilton Beach, USA), submetidos à diluição seriada em PBS estéril e plaqueados em placas de TSA com hemoglobina. Após cinco a sete dias em estufa à 37°C e 5% de CO₂ as colônias foram contadas e o valor de UFC por grama de órgão (UFC/g) foi estimado.

4.2.4 Histopatologia

Fragmentos de baço e fígado foram fixados em formolína 10% e processados para a técnica de inclusão em parafina: desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e embebidos pela parafina. Após o processamento histológico, foram realizados cortes em micrótomo de 5 µm de espessura e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Os cortes histológicos de fígado e baço foram analisados por microscopia de luz e avaliados quanto à inflamação de acordo com os seguintes critérios: escore 0 – ausência de lesão; escore 1 – lesão discreta; escore 2 – lesão moderada e escore 3- lesão acentuada.

4.2.5 Imunoistoquímica

Foi realizada a imunoistoquímica dos tecidos de acordo com o protocolo descrito por Silva et al., (2011a). Os cortes histológicos foram colocados em lâminas silanizadas e diafanizados, hidratados em álcool decrescente, lavados com PBS por 5 minutos e incubados com solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 30 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Após lavar novamente com PBS, as lâminas foram transferidas para câmara úmida à temperatura ambiente e incubadas com solução de leite em pó desnatado (25µg/mL) por 45 minutos, para diminuir marcações inespecíficas no corte. Posteriormente, os cortes foram incubados por 30 minutos com anticorpo primário, utilizando soro policlonal (de coelhos experimentalmente infectados com por *B. ovis*) na

diluição 1:5000. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes com PBS, incubados com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos, seguida de nova lavagem com PBS e incubação por 20 minutos com complexo de estreptoavidina-peroxidase de kit comercial (LSAD + Kit, DAKO Corporation, CA, USA). A reação foi revelada com 0,024% de dianobenzidina (DAB, Sigma, USA) e os cortes contra corados com Hematoxilina de Mayer.

4.2.6 Extração RNA total e RT-PCR quantitativo

A avaliação quantitativa de RNA mensageiro transcrito para quimiocinas e citocinas no baço dos diferentes animais infectados por *B. ovis* foi realizada por RT-PCR em tempo real. Foram utilizados fragmentos de baço dos animais infectados por sete dpi e armazenados em criotubos a -80°C. Para avaliar a indução de inflamação dos camundongos *knockout* infectados com *B. ovis* foi avaliada a expressão da MIP-2 ou CXCL2 (*Chemokine (C-X-C motif ligand 2)*), quimiotático para neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Já para avaliar a respostas imunológica adaptativa foram avaliadas as citocinas IL-12, IFN- γ , IL-4 e IL-10. Os primers utilizados neste estudo estão descritos na tabela 3.

Amostras de RNA total foram extraídas do baço dos animais *knockout* para MyD88 e TLR9 e seus respectivos controles. Para isso, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em Trizol (Tri reagent, Sigma Aldrich, USA) e depois centrifugadas a 12.000g por 15 minutos com clorofórmio para separação de fases. O sobrenadante (fase aquosa) foi coletado e após adição de isopropanol e centrifugação a 12.000g por 10 minutos houve precipitação do RNA total. O precipitado resultante foi então lavado com álcool 75% por 5 minutos em rotação de 7.500g. As amostras foram ressuspendidas em água livre de Rnases e submetidas a análise em espectrofotômetro e eletroforese para definição da concentração e integridade do RNA, respectivamente. Após a extração, as amostras foram preservadas a -80°C.

Após a extração de RNA foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa com o kit comercial *Superscript™ First Strand Synthesis for RT-PCR* (Invitrogen, USA) de acordo com protocolo do fabricante. A concentração de RNA utilizada para a síntese de cDNA foi 1500 ng. Para a preparação da RT-PCR

em tempo real adicionou-se 17 µl de *Sybr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA), 3 µl de primer a 10 µM (tabela 4) e 2 µl de cDNA. A reação foi realizada em equipamento ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystem) com os seguintes parâmetros: 50°C por dois minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados com o método CT comparativo descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os valores de CT foram normalizados com base na expressão de GAPDH.

Tabela 3: Primers utilizados para a RT-PCR.

Gene	Sequência alvo (5'a 3')	Referências
TNF- α	<i>Senso</i> : CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA	<i>Paixão et al (2009)</i>
	<i>Anti-senso</i> TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	
MIP-2	<i>Senso</i> : AGTGA ACTGCGCTGTCAATGC	<i>Paixão et al (2009)</i>
	<i>Anti-Senso</i> : AGGCAA ACTTTTTGACCGCC	
IL-6	<i>Senso</i> : GAGGATACCACTCCCAACAGACC	<i>Paixão et al (2009)</i>
	<i>Anti-senso</i> : AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	
IL-12	<i>Senso</i> : GGAAGCACGGCAGCAGAATA	<i>Paixão et al (2009)</i>
	<i>Anti-senso</i> : AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG	
IFN- γ	<i>Senso</i> : TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	<i>Paixão et al (2009)</i>
	<i>Anti-senso</i> : TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	
IL -10	<i>Senso</i> : GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	<i>Paixão et al (2009)</i>
	<i>Anti-senso</i> : ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	
IL-4	<i>Senso</i> : CAACGAAGAACACCACAGAG	<i>Khan et al (2012)</i>
	<i>Anti-senso</i> : GGACTTGGACTCATTCATGG	
GAPDH	<i>Senso</i> : TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	<i>Paixão et al (2009)</i>
	<i>Anti-senso</i> : AGGTCCGGTGTGAACGGATTTG	

4.2.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Todos os dados em UFC foram transformados para a escala logarítmica, as médias calculadas e comparadas pelo teste T de student (Graphpad Prism 5, USA). Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$. Os dados em porcentagem do peso de baço em relação ao peso vivo e escore de lesão histopatológica de fígado e baço foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney e os valores considerados significativos quando $p < 0,05$ (Graphpad Prism 5, USA). Os dados de transcrição gênica foram normalizados com base na

expressão de GAPDH e as médias dos grupos foram comparadas pelo teste T de Student (Graphpad Prism 5, USA). Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Avaliação do fator sexo durante a infecção por *B. ovis* em camundongos

Devido as dificuldades na criação e obtenção de animais *knockouts*, neste estudo foi necessário utilizar camundongos de ambos sexos, Então, inicialmente foi realizada a cinética de infecção por *B. ovis* em machos e fêmeas C57BL6 para verificar a influência do sexo no curso da infecção em camundongos. Os animais foram infectados com aproximadamente 1×10^6 UFC/ml de *B. ovis* e após um, sete e 30 dpi, a colonização bacteriana em baço e fígado foram mensuradas. Após 24 horas de infecção, machos e fêmeas apresentaram níveis de colonização esplênica (Fig. 1A) e hepática (Fig. 1B) semelhantes. O mesmo comportamento foi observado em outros tempos de infecção estudados (Fig.1).

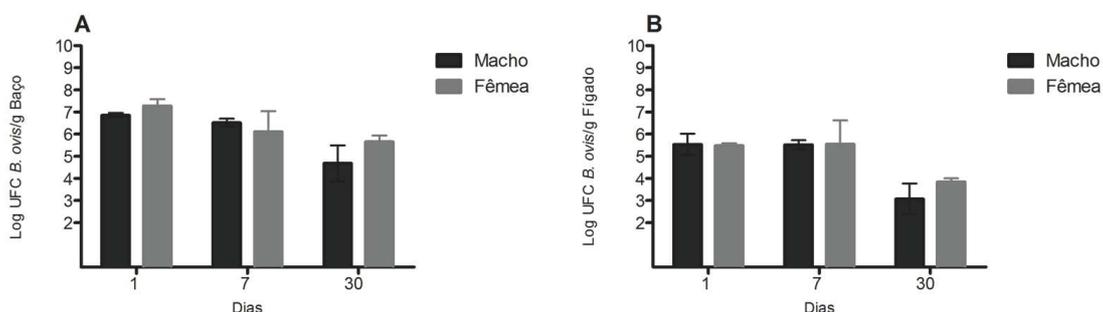


Figura 1: **Cinética de infecção de camundongos C57/BL6 machos (n=4) e fêmeas (n=5).** Os animais foram infectados por via intraperitoneal com aproximadamente 1×10^6 UFC/animal de *Brucella ovis*. Após um, sete e 30 dpi a colonização bacteriana de baço (A) e fígado (B) foram mensuradas. As UFC foram submetidas a transformação logarítmica e analisadas pelo teste T de Student. As barras representam as médias e o erro padrão da média.

Em seguida, o peso do baço foi medido como um indicio de aumento de resposta inflamatória, uma vez que camundongos infectados com *B. ovis* apresentam esplenomegalia devido a aumento de células inflamatórias ou hiperplasia linfóide no baço (Silva et al., 2011a). A porcentagem do peso do baço em relação ao peso corporal

foi calculada, visto que há variação entre o peso de cada animal. No primeiro dia de infecção não foi observado esplenomegalia em nenhum dos animais. Já aos sete e 30 dpi, houve um aumento do peso do baço que foi semelhante estatisticamente entre machos e fêmeas (teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney). As médias de cada grupo em diferentes tempos de infecção estão na tabela 4. A esplenomegalia de camundongos C57/BL6 observada neste estudo tem um padrão semelhante ao observado por Silva et al (2011a).

Tabela 4: Esplenomegalia determinada pelo peso relativo do baço (%) de camundongos infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção

Dias pós-infecção	1	7	30
Macho	0.52	1.73	0.99
Fêmea	0.39	1.95	1.5

Fragmentos de baço e fígado foram examinados por microscopia de luz para avaliação do processo inflamatório. As lesões observadas nestes órgãos eram caracterizadas por microgranulomas multifocais constituídos predominantemente por macrófagos, com alguns neutrófilos e linfócitos. Os resultados estão representados na tabela 5 e correspondem às médias do escore de cada grupo experimental. Após um dpi não foram observadas lesões inflamatórias, porém aos sete dpi ambos os sexos apresentaram microgranulomas moderados a acentuados, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos (teste estatístico Mann-Whitney). Aos 30 dpi as lesões foram consideradas discretas a moderada em machos e fêmeas.

Tabela 5: Escore de lesão em camundongos infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção

Dias pós-infecção	1		7		30	
	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço*	Fígado
Macho	0	0	1.75	2.75	-	1.5
Fêmea	0	0	2.25	2.4	1.5	1.6

* Amostras de baço dos animais machos submetidos a eutanásia aos 30 dpi foram perdidas durante o processamento histológico e por isso não foram avaliadas.

Estes dados indicam que o sexo não é um fator importante de variação experimental no modelo de infecção por *B. ovis* com camundongos C57/BL6. Camundongos machos e fêmeas desta linhagem apresentaram colonização bacteriana e resposta inflamatória, em baço e fígado estatisticamente semelhante em todos os tempos de infecção. Dessa forma, neste estudo foram utilizados camundongos de ambos os sexos para os experimentos *in vivo*.

4.3.2 Participação dos receptores TLR2, 4, 9 e MyD88 no reconhecimento de *B. ovis* em camundongos C57/BL6

Primeiramente, para verificar se os receptores TLR estão envolvidos no reconhecimento e desencadeamento de resposta inflamatória durante a infecção por *Brucella ovis* testou-se a susceptibilidade de camundongos *knockout* para a molécula adaptadora MyD88, visto que essa molécula participa da sinalização intracelular de TLR envolvidos no reconhecimento bacteriano (Watters et al., 2007; Kawai e Akira, 2010). Para isso, dez camundongos MyD88 *-/-* e dez camundongos C57/BL6 selvagens (WT) foram inoculados com *B. ovis* e a colonização bacteriana de baço e fígado dos animais foi mensurada após sete dpi. Os animais MyD88 *-/-* apresentaram 1,09 log UFC/g de baço de *B. ovis* a mais comparado ao o grupo controle após sete dpi (Fig. 2A). Interessante, não foi observada diferença significativa na quantidade de bactéria recuperada do fígado (Fig. 2B).

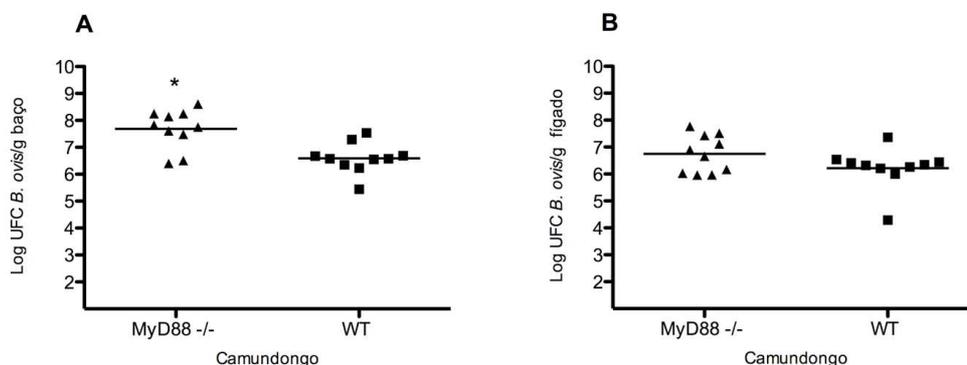


Figura 2: Susceptibilidade dos camundongos *Knockout* MyD88 (n=10) aos 7dpi. Os animais foram infectados via intraperitoneal com dose aproximada de 1×10^6 UFC/mL de *Brucella ovis* e após 7 dpi fragmentos de baço (A) e fígado (B) foram coletados para contagem bacteriana. As UFC foram submetidas a transformação logarítmica e analisadas pelo teste T de Student. Os dados são

representativos de dois experimentos distintos. Os asteriscos representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

Aos 30 dpi, observou-se redução da carga bacteriana em baço e fígado comparado ao sete dpi, sendo recuperado 6,46 log UFC/g de baço e 5,10 log UFC/g de fígado dos animais MyD88 $-/-$ ($n=2$), enquanto a quantidade de UFC/g recuperada dos camundongos C57/BL6 selvagens ($n=4$) foi 4,67 log/g de baço e 3,07 log/g de fígado. Embora o número animais infectados seja pequeno aos 30 dpi, a recuperação bacteriana em camundongos MyD88 $-/-$ foi 1,79 log UFC/g de baço e 2,03 log UFC/g de fígado maior que no grupo controle aos 30 dpi. Devido ao baixo número de animais não foi possível realizar testes estatísticos. Os dados bacteriológicos indicam que MyD88 contribui para melhor controle da infecção por *B. ovis* no modelo murino.

O MyD88 é necessário para a cascata de sinalização intracelular iniciada pela ativação dos receptores TLR, cujo efeito final é a transcrição de genes pró-inflamatórios e citocinas (Kawai e Akira, 2010). Considerando que MyD88 contribui para controle da infecção por *B. ovis* em camundongos, investigou-se o papel dos TLR 2, 4 e 9 mediados por MyD88 durante a infecção por *B. ovis*. Camundongos C57/BL6 *knockout* para TLR2 ($n=8$), TLR4 ($n=9$) e TLR 9 ($n=6$) foram inoculados com *B. ovis* via intraperitoneal e após sete dpi a colonização bacteriana do baço e fígado desses animais foi mensurada. Não foi observado diferenças de contagem bacteriana do baço ou fígado dos animais TLR2 $-/-$ e TLR4 $-/-$ após o período de infecção quando comparados com camundongos selvagens (Fig. 3A-D). Entretanto, os camundongos TLR9 $-/-$ apresentaram recuperação bacteriana 1 log UFC/g de baço maior que o grupo controle (Fig. 3E). Contudo, não foi observada diferença na colonização bacteriana do fígado de animais TLR9 $-/-$ e o grupo controle (Fig. 3F).

Visto que somente TLR9 influencia fase aguda de infecção por *B. ovis*, a colonização bacteriana de animais deficientes em TLR9 foi avaliada durante a fase crônica da infecção. Para isso, cinco camundongos TLR9 $-/-$ foram inoculados com *B. ovis* e submetidos a eutanásia 30 dpi. Não houve diferença na recuperação bacteriana o baço e fígado entre camundongos TLR9 $-/-$ e selvagens (Fig. 4). Juntos, os dados indicam que os receptor de imunidade inata TLR9 e molécula adaptadora MyD88 são importantes

para melhor controle de *B. ovis* no modelo murino durante fase aguda de infecção, enquanto TLR2 e TLR4 não contribuíram para eliminação de *B. ovis* neste modelo experimental.

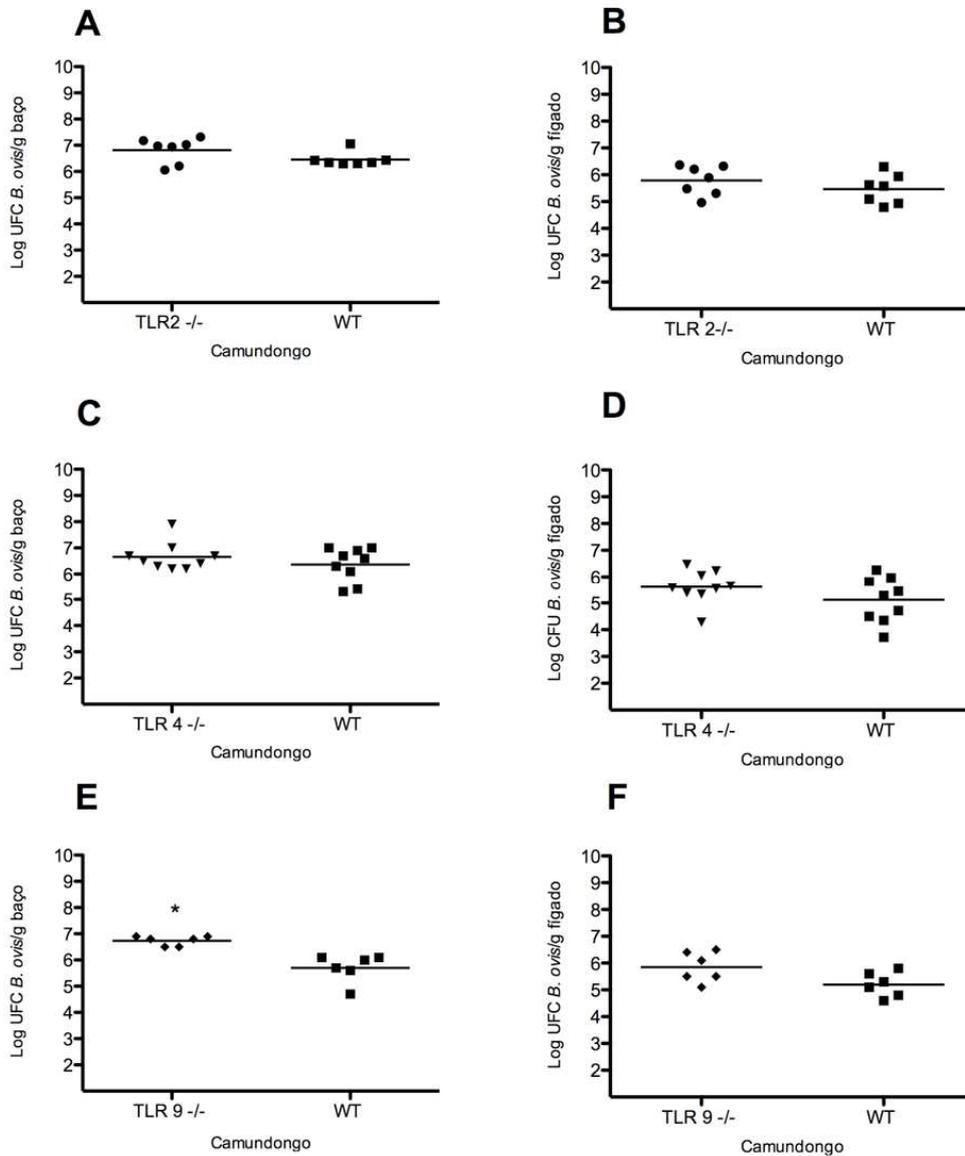


Figura 3: Suscetibilidade dos camundongos *Knockout* para TLR2 (n=8), TLR4 (n=9) e TLR9 (n=6) à infecção por *Brucella ovis* aos sete dpi. Os animais foram infectados via intraperitoneal com dose aproximada de 1×10^6 UFC/animal e após sete dpi fragmentos de baço e fígado foram coletados para contagem bacteriana. As UFC foram submetidas a transformação logarítmica e analisadas pelo teste T de Student. Os dados de TLR2 e TLR4 são representativos de dois experimentos distintos e os dados de TLR9 de um único experimento. Os asteriscos representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

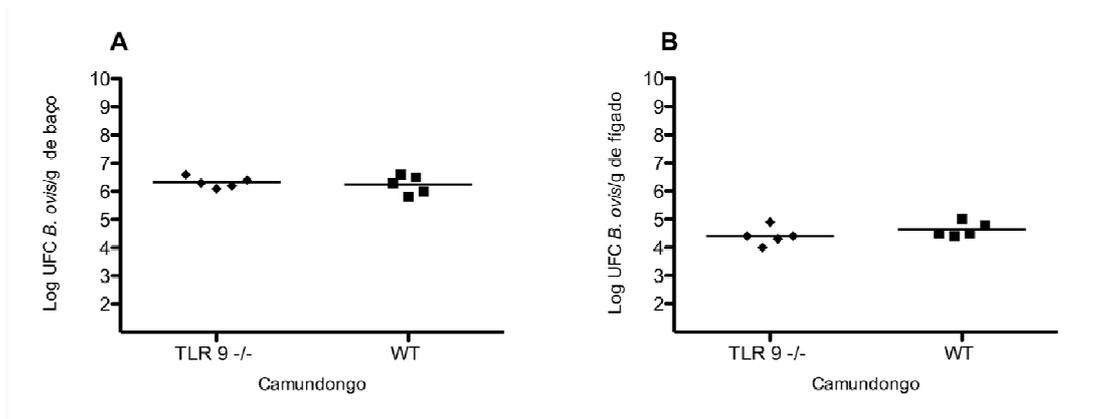


Figura 4: **Susceptibilidade dos camundongos *Knockout* para TLR9 (n=5) aos 30dpi**. Os animais foram infectados via intraperitoneal com dose aproximada de 1×10^6 UFC/mL e 30 dpi fragmentos de baço (A) e fígado (B) foram coletados para contagem bacteriana. As UFC foram submetidas a transformação logarítmica e analisadas pelo teste T de Student. Os dados são representativos um único experimento.

As vias de sinalização desencadeadas pelo reconhecimento por receptores TLR estão envolvidas na resposta imunológica inata e um de seus mecanismos efetores é a inflamação. Por isso, para verificar se a maior susceptibilidade dos animais *knockout* acima citados é devido a alterações no desencadeamento do processo inflamatório, avaliou-se a resposta inflamatória desses animais durante infecção por *B. ovis*. Primeiramente, a esplenomegalia foi avaliada como indício de inflamação. O peso relativo médio do baço de camundongos C57/BL6 selvagens não infectados é 0,41% do peso corporal. Os animais TLR2 *-/-* e TLR4 *-/-* apresentaram esplenomegalia, mas não houve diferença significativa entre as médias do peso do baço desses animais e seus respectivos grupos controles (Fig. 5A e 5B). Entretanto, os animais TLR9 *-/-* apresentaram peso relativo do baço maior quando comparados com o grupo controle. Os animais MyD88 *-/-* apresentaram aumento de volume esplênico discreto em relação aos demais camundongos *knockouts* e este aumento de volume foi menor do que o observado em camundongos selvagens.

Em seguida, foi realizada a avaliação histopatológica de baço e fígado para avaliação de lesões inflamatórias. As alterações histológicas observadas foram consistentes com o descrito por Silva et al. (2011a): em ambos órgãos observou-se a formação de microgranulomas caracterizados por acúmulos de células inflamatórias concêntricas,

constituídos predominantemente por macrófagos e com raros neutrófilos no centro da lesão. Em algumas lesões também eram observados linfócitos e plasmócitos. Tamanho e quantidade dos microgranulomas no corte histológico foram utilizados como critérios para a indicação do escore.

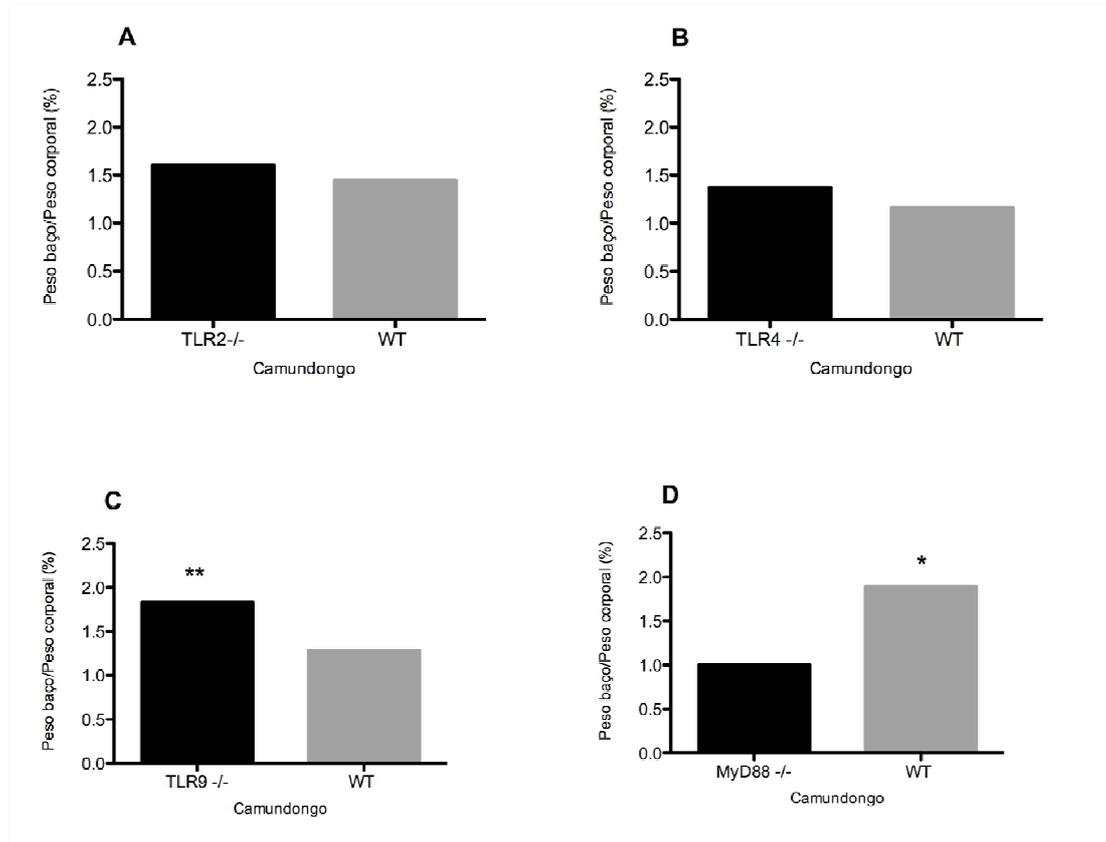


Figura 5: Esplenomegalia em camundongos *Knockout* para TLR2 (n=8), TLR4 (n=9), TLR9 (n=6) e MyD88 (n=10) infectados com *Brucella ovis* após 7 dpi. Os animais foram infectados via intraperitoneal com dose aproximada de 1×10^6 UFC/animal e 7 dpi o baço foi pesado e a porcentagem do peso do baço em relação ao peso corporal foi calculada. Os dados foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney. As barras representam as médias. Os asteriscos representam diferença significativa entre os grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Os animais MyD88 -/- apresentaram o menor escore de inflamação tanto no baço quanto fígado, o que condiz com o baixo aumento de volume esplênico (Tabela 6). Esses animais exibiram microgranulomas pequenos e escassos (Fig. 6A). Ao contrário, no baço e fígado de camundongos TLR9 -/- observou-se microgranulomas grandes e numerosos (Fig. 7). Não houve diferença no escore de inflamação de baço e fígado de animais TLR4 -/- e os camundongos TLR2-/- apresentaram inflamação mais acentuada

apenas no fígado. Aos 30 dpi, os animais TLR9 *-/-* e seus respectivos controles apresentaram diminuição das lesões inflamatórias em baço e fígado, representada por menor escore de inflamação (Tabela 7). Neste tempo de infecção não houve diferença significativa de escore de lesão em baço e fígado. Foi realizada imunomarcagem para associação entre as lesões e *B. ovis* e observou-se imunodeteção intralesional de *B. ovis* em citoplasma de macrófagos constituintes dos microgranulomas (Fig. 6C). Isso indica que as lesões observadas nos animais são decorrentes da infecção por *B. ovis*.

Tabela 6: Escore de inflamação em órgãos de camundongos infectados por *Brucella ovis* aos sete dpi*

Camundongo	Baço**	Fígado
TLR 2 $-/-$	1.14 (n=7)	1.37 ^A (n=8)
Controle	1.71 (n=7)	2.28 ^B (n= 7)
TLR 4 $-/-$	1.89 (n=9)	1.77 (n=9)
Controle	1.38 (n=8)	2.44 (n=9)
TLR9 $-/-$	2.6 ^A (n=5)	2.50 (n=6)
Controle	1.0 ^B (n=6)	2.33 (n=6)
Myd88 $-/-$	0.67 ^A (n=9)	1.10 ^A (n=10)
Controle	1.78 ^B (n=9)	2.40 ^B (n=10)

* Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste não paramétrico Mann-Whitney entre o grupo de camundongos *knockout* e seu respectivo grupo controle (P<0,05)

** Fragmentos de baço de alguns animais foram perdidos durante o processamento histológico e por isso não foram analisados.

Tabela 7: Escore de lesão de camundongos infectados com *Brucella ovis* aos 30dpi

Camundongo	Baço	Fígado
TLR9 $-/-$	1.5 (n=4)	1.0 (n=4)
Controle	0.75 (n=4)	1.5 (n=4)

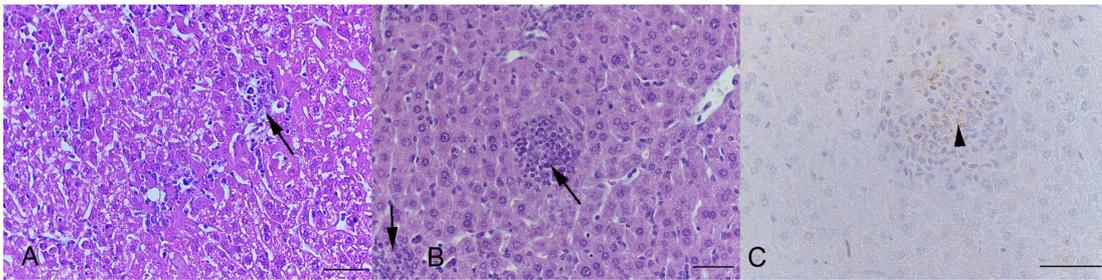


Figura 6: **Histopatologia e imunomarcção de fígado de animais *knockout* MyD88 após 7 dpi com *Brucella ovis*.** (A) Fígado de animal MyD88^{-/-} após sete dias de infecção por *B. ovis* com microgranulomas multifocais (setas) escassos e hipocelulares. Escore de inflamação 1, HE, barra 100µm. (B) Fígado de camundongo selvagem após 7 dias de infecção por *B. ovis* com microgranulomas multifocais (setas) com população celular moderada. Escore de inflamação 2, HE, barra 100µm. (C) Imunomarcção intralésional de *B. ovis* em fígado de camundongo MyD88^{-/-}. A cabeça da seta indica a bactéria imunomarcada em citoplasma de macrófagos. Estreptoavidina-peroxidase, barra 100µm.

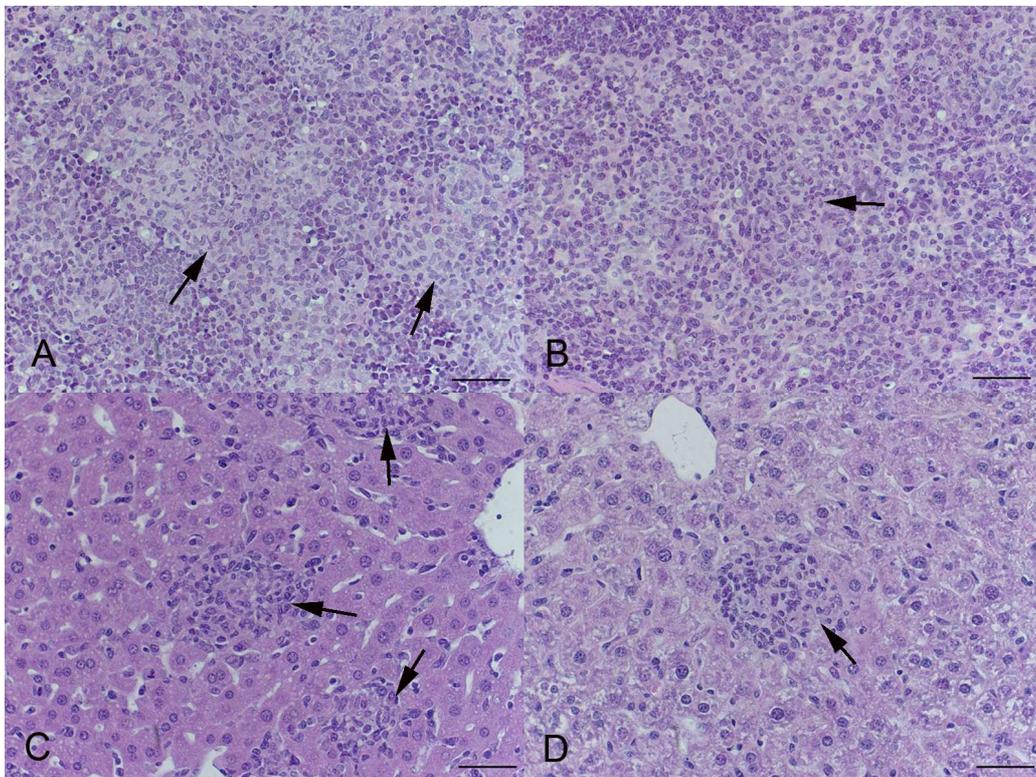


Figura 7: **Histopatologia de camundongos *Knockout* para TLR9 infectados com *B. ovis* após 7dpi.** (A) Baço de animal TLR9^{-/-} com escore de inflamação 3. Microgranulomas multifocais na polpa vermelha constituídos predominantemente por macrófagos e alguns neutrófilos (setas), HE, Barra 100µm. (B) Baço de camundongo selvagem com microgranuloma pequeno na polpa vermelha (seta) e infiltrado neutrofílico multifocal discreto. Escore de inflamação 1, HE, barra 100µm. (C) Fígado de camundongo TLR9^{-/-} com escore de inflamação 3. Microgranulomas multifocais no parênquima composto por macrófagos e alguns neutrófilos (seta), HE, barra 100µm. (D) Fígado de camundongo selvagem com microgranuloma no parênquima. Escore de inflamação 2, HE, barra 100µm.

A fim de determinar se as diferenças observadas em relação à colonização bacteriana e inflamação nos animais MyD88 $-/-$ e TLR9 $-/-$ estavam relacionadas a diferenças no perfil de expressão de citocinas envolvidas em inflamação e imunidade adaptativa realizou-se RT-PCR em tempo real. A resposta pró-inflamatória dos animais MyD88 $-/-$ aos sete dpi foi menor quando comparada aos animais controles: observou-se diferença significativa na transcrição de TNF- α e IL-6 (Fig. 8A). Apesar dos microgranulomas em órgãos dos animais *knockout* para MyD88 serem menores, não foram observadas diferenças em relação ao número de cópias de MIP-2, uma molécula quimiotática para neutrófilos (Fig. 8A). Não houve diferenças da resposta pró-inflamatória dos animais TLR9 $-/-$ aos sete dpi, apenas uma expressão discretamente maior de MIP-2 (fig.8B).

A transcrição de genes relacionados ao desenvolvimento de resposta imunológica adaptativa, como IL-12 foi baixa, apesar de quantidades similares do número de cópias de IFN- γ em camundongos *Knockout* e selvagens (Fig. 8). As citocinas envolvidas em resposta Th2, IL-10 e IL-4, também apresentaram baixo número de cópias (Fig. 8). Contudo, os animais MyD88 $-/-$ e TLR9 $-/-$ tiveram transcrição de IL-10 discretamente maior que os animais do grupo controle.

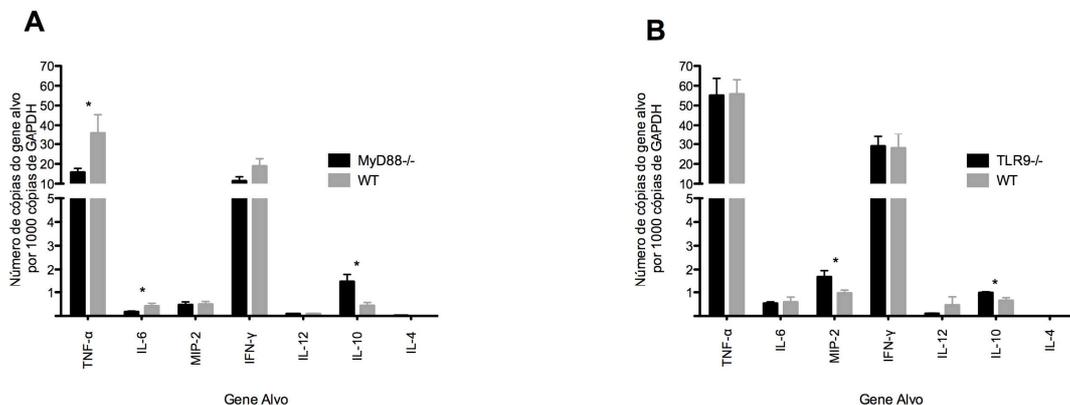


Figura 8: **Transcrição de moléculas pró-inflamatórias e citocinas em baço de camundongos MyD88 $-/-$ (A) e TLR9 $-/-$ (B) aos sete dpi.** Baço de animais infectados com *Brucella ovis* foram coletados para análise de expressão gênica para citocinas e quimiocinas. O valor de Δ CT foi calculado e normalizado a partir da expressão de GAPDH. As médias dos grupos foram submetidas ao teste T de Student. As barras representam as médias e o erro padrão da média. Os asteriscos representam diferença significativa entre os grupos (* $p < 0,05$).

4.4 Discussão

A sinalização TLR é uma importante via de reconhecimento de patógenos do sistema imunológico inato (Kawai e Akira, 2010). A sua relação com a imunidade contra *Brucella* é bem descrita para *B. abortus* e *B. melitensis* (Campos et al., 2004; Huang et al., 2005; Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007; Copin et al., 2007; Macedo et al., 2008). Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, a importância da via de sinalização TLR durante infecção aguda por *B. ovis* em modelo murino. Inicialmente, observou-se a necessidade da molécula adaptadora MyD88 funcional para melhor controle da infecção e desencadeamento do processo inflamatório. Isso foi demonstrado aos sete dpi pela menor esplenomegalia, maior colonização bacteriana esplênica, e menor intensidade de inflamação no baço de animais MyD88 -/- quando comparada aos animais selvagens.

Resultados semelhantes foram observados em camundongos MyD88 -/- infectados com *B. abortus* na fase aguda (Weiss et al., 2005). Carvalho et al. (2011) demonstraram que *Mycobacterium avium* induz formação de microgranulomas hepáticos com menor número de células inflamatórias em camundongos com resposta deficiente via MyD88, possivelmente devido menor produção de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, não houve diferença entre a colonização hepática dos camundongos MyD88-/- e selvagens, apesar de menor intensidade de inflamação nos animais *knockout*, caracterizada por diminuição no número e tamanho dos microgranulomas. A menor inflamação no fígado dos MyD88 -/- pode ter limitado quantidade de bactéria presente neste órgão onde *Brucella* depende das células inflamatórias, predominantemente macrófagos para estabelecer seu nicho replicativo (Silva et al., 2011b; Copin et al., 2012). Em um recente estudo com microscopia confocal, Copin et al. (2012) demonstraram que camundongos MyD88-/- infectados com *B. melitensis* apresentam granulomas menores, com menor número de macrófagos e um aumento no número de granulócitos comparados aos animais selvagens. Vale ressaltar que a inflamação embora reduzida, esteve presente no baço e fígado de alguns animais MyD88 sugerindo que existem outras vias de indução de inflamação independente da ativação TLR via MyD88.

Receptores TLR via MyD88 ativam fator transcrição nuclear NF- κ B favorecendo a transcrição de genes e produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (Moresco

et al., 2011). A menor intensidade de inflamação observada em camundongos deficientes MyD88 durante infecção por *Brucella* tem sido associada menor produção de citocinas pró-inflamatórias (Huang et al. 2003; Weiss et al., 2005; Macedo et al. 2008). A quantificação do número de cópias de RNA mensageiro para citocinas pró-inflamatórias revelou que os animais MyD88^{-/-}, quando infectados com *B. ovis*, expressam menor quantidade de TNF- α que os camundongos selvagens. Estes dados são similares a outros estudos que demonstraram menor produção de TNF- α por macrófagos e camundongos deficientes em MyD88 quando estimulados com *B. abortus* (Huang et al. 2003; Weiss et al., 2005; Macedo et al. 2008).

O TNF- α é uma importante citocina produzida por fagócitos mononucleares e uma de suas funções é promover o recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção, por estimular a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Abbas e Lichtman, 2005). Além disso, esta citocina é considerada importante para a resistência do hospedeiro à infecção por *Brucella*. Camundongos previamente tratados com anticorpos anti-TNF- α se tornaram mais susceptíveis a infecção *B. abortus* e essa maior susceptibilidade foi indicada por aumento de colonização esplênica e menor tamanho de baço (Zhan et al., 1996). Estas características foram observadas no presente estudo e corrobora com a hipótese de que a baixa transcrição de TNF- α pode estar relacionada com a maior susceptibilidade dos animais MyD88^{-/-}.

A IL-6 é outra citocina envolvida em ativação de mecanismos pró-inflamatórios, principalmente estímulo a síntese de proteínas de fase aguda (Abbas e Lichtman, 2005). Adicionalmente, Liu et al. (1994) demonstraram que a IL-6 é necessária para a ativação de linfócitos T a produzirem IFN- γ em camundongos infectados com o patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*. Assim como o TNF- α , a transcrição de IL-6 mostrou-se reduzida em animais MyD88^{-/-} quando comparado com camundongos selvagens. A produção de IL-6 por camundongos e células infectadas por *B. abortus* viva ou morta pelo calor foi descrita por alguns autores (Sauders et al., 1993, Zhan et al., 1993a; Giambartolomei et al., 2004), apesar da produção desta citocina induzida pela *Brucella spp* ser em menor intensidade que os níveis estimulados por outras bactérias Gram negativo como *Salmonella* (Barquero-Calvo et al., 2007). Acredita-se

que a produção de IL-6 seja desencadeada pelo estímulo de lipoproteínas da bactéria em receptores do hospedeiro, especialmente TLR2 (Giambartolomei et al., 2004).

Assim como o TNF- α , a IL-12 é apontada como uma importante citocina para a resposta imunológica protetora contra *Brucella* (Zhan et al., 1996). A IL-12 é produzida por células apresentadoras de antígenos e estimula linfócitos a produzirem IFN- γ . Este por sua vez, estimula macrófagos a produzirem reativos de oxigênio que possuem efeitos bactericidas (Abbas e Lichtman, 2005). A produção de IFN- γ pelo hospedeiro é fundamental para uma resposta efetora contra *Brucella*. Camundongos deficientes em IFN- γ são mais susceptíveis a infecção por *Brucella* (Zhan et al., 1993b; Murphy et al., 2001). Neste estudo, não observou-se diferença na transcrição de IL-12 nem IFN- γ entre os animais MyD88 -/- e selvagens infectados com *B. ovis*. Estes dados são distintos do observado por outros autores que demonstraram menor produção de IL-12 e IFN- γ em camundongos MyD88 -/- infectados com *B. abortus* morta pelo calor (Huang et al. 2005; Macedo et al. 2008). Contudo, estes trabalhos mensuraram a produção destas citocinas por ensaios de ELISA e em sobrenadantes de cultivos celulares, que podem ter contribuído para a diferença dos resultados.

A IL-10 possui um efeito contrário à IL-12, ou seja, inibe a ativação de macrófagos e células dendríticas e conseqüentemente a resposta Th1 (Abbas e Lichtman, 2005). Fernandes e Baldwin (1995) demonstraram que camundongos BALB/C infectados com *B. abortus* produziam IL-10 após sete dpi. Quando essa citocina foi neutralizada por anticorpos, os animais apresentaram colonização bacteriana esplênica mais baixa que os animais que não foram submetidos a neutralização. Isso indica que a IL-10 possui um efeito deletério para o desenvolvimento de resposta imunológica contra *B. abortus* e acredita-se que isso ocorre pelo fato dessa citocina interferir com a produção de IFN- γ (Fernandes e Baldwin, 1995). Nos animais MyD88 -/- a transcrição de IL-10 estava discretamente aumentada, o que pode ter contribuído para o aumento de susceptibilidade desses animais, apesar da transcrição de IFN- γ não ter sido afetada.

Como o MyD88 é uma molécula adaptadora que participa da via de sinalização dos TLR, exceto TLR3 (Kawai e Akira et al., 2010), foi investigado a participação de receptores TLR sabidamente envolvidos com reconhecimento de *Brucella*. Observou-se

que os receptores TLR2 e TLR4 não são necessários para melhor eliminação de *B. ovis* durante fase aguda de infecção, comprovado pela colonização bacteriana em baço e fígado semelhante aos camundongos selvagens. Estes dados corroboram com os fenômenos observados em infecção de *B. abortus* em camundongos *knockout* para estes receptores (Weiss et al., 2005; Barquero-Calvo et al., 2007) apesar de alguns estudos indicarem a importância do TLR4 para controle da infecção por *B. abortus* (Campos et al., 2004) e *B. melitensis* (Copin et al., 2007). Contudo, não havia conhecimento do papel do receptor TLR4 durante infecção de camundongos por uma amostra de *Brucella* com LPS naturalmente rugoso, como *B. ovis*. O presente estudo demonstra que o TLR4 não é importante para o controle da infecção da *B. ovis* em camundongos. Interessantemente, diferença de inflamação foi observada apenas no fígado de camundongos TLR2 *-/-*. A menor produção de TNF- α , dependente de TLR2 via MyD88 pode ter contribuído para menor intensidade de inflamação no fígado de TLR2 *-/-* comparada aos animais selvagens, como observado em estudo com *B. abortus* realizado por Huang et al. (2003).

Em contrapartida, os animais TLR9 *-/-* apresentaram maior colonização bacteriana esplênica indicando maior susceptibilidade a *B. ovis* na fase aguda de infecção. Entretanto, este efeito desaparece na fase crônica de infecção, na qual recuperação de *B. ovis* em baço e fígado em camundongos TLR9 *-/-* foi semelhante aos animais selvagens. Ao contrário do que era esperado, os animais TLR9 *-/-* apresentaram maior esplenomegalia e lesões inflamatórias mais acentuadas no baço quando comparados com os camundongos selvagens. Não foi observada diferença na intensidade inflamação no fígado entre os dois grupos.

Fenômeno semelhante foi observado durante infecção experimental de camundongos *knockout* para TLR9 com a bactéria Gram negativo *Neisseria meningitidis*, que causa meningite e sepse. Nesse estudo, os animais apresentaram maior recrutamento de macrófagos no sangue, apesar de apresentarem maior dificuldade para controlar a infecção por produzirem menor quantidade de óxido nítrico (Sjolinder et al., 2008). Em um modelo experimental murino para sepse observou-se que animais TLR9 *-/-* apresentavam maior recrutamento de células inflamatórias para o peritônio, especialmente granulócitos. Mas, ao contrário do que observado no presente estudo, esse aumento de células inflamatórias aumentou a resistência dos animais à infecção

(Plitas et al., 2008). Albiger et al. (2007) também observaram que camundongos TLR9^{-/-}, apesar de mais susceptíveis à infecção por *Streptococcus pneumoniae*, apresentaram maior influxo de macrófagos e neutrófilos em pulmões. Contudo, estes trabalhos não justificam a razão pela qual os animais TLR9^{-/-} apresentam maior inflamação. Sjolinder et al. (2008) sugerem que estes animais apresentem um aumento de migração de leucócitos. Todos estes dados sugerem uma maior resistência a infecção bacteriana não está sempre diretamente associada a capacidade de induzir inflamação. Outros mecanismos participam do controle do patógeno nos tecidos.

Embora expressão gênica de TNF- α mostrou-se semelhante entre os dois grupos, maior expressão gênica para MIP-2, quimiotático para neutrófilos, foi detectada nos animais TLR9^{-/-} comparado com animais selvagens. Similarmente, Macedo et al. (2008) também não detectou a influência do TLR9 sobre produção de TNF- α em macrófagos murinos estimulados com *B. abortus* morta pelo calor. Adicionalmente, o aumento na expressão de quimiocinas específicas pode favorecer aumento da inflamação em determinados órgãos. Behera et al. (2006) demonstraram que camundongos MyD88^{-/-} são mais susceptíveis a colonização em diversos órgãos por *Borrelia burgdorferi*, espiroqueta causadora da doença de Lyme, embora apresentem inflamação semelhante na articulação e coração, mas miosite e nefrite mais intensas que nos animais selvagens. Esta maior intensidade de inflamação está associada a expressão gênica diferenciada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias nos órgãos afetados.

Os camundongos TLR9^{-/-} infectados com *B. ovis* além de não apresentarem deficiência em relação à resposta inflamatória, também não apresentaram falhas em desenvolver uma resposta imunológica protetora, o que foi observado com a expressão gênica de citocinas relacionadas com resposta Th1, como IFN- γ , semelhante aos camundongos selvagens. Isto indica que o aumento de colonização bacteriana neste caso não é devido a incapacidade do hospedeiro responder ao agente invasor. Uma possível explicação para o fenômeno observado é que como macrófagos são células utilizadas pela *Brucella* para multiplicação e persistência (Martirosyan et al., 2011), o aumento destas células nos animais TLR9^{-/-} propiciou um aumento no nicho replicativo da bactéria no baço.

O aumento de susceptibilidade dos animais MyD88^{-/-} pode ser atribuído parcialmente à via de sinalização TLR9, uma vez que a diminuição da resposta inflamatória dos

animais MyD88 $-/-$ foi mais acentuada. Além das vias de sinalização TLR, o MyD88 também atua como mediador de cascata intracelular dos receptores IL-1R (Wesche et al., 1997; Adachi et al., 1998; Burns et al., 1998) e IL-18R (Adachi et al., 1998), que possuem o domínio TIR em comum com os receptores TLR (Watters et al., 2007). A interação entre IL-1 e seu receptor ativa uma cascata de sinalização intracelular mediada por MyD88 que gera a ativação de NF- κ B e expressão gênica de citocinas e quimiocinas (Wesche et al., 1997).

Estudos com *B. abortus* não demonstraram participação das vias de sinalização IL-1R e IL-18R. Weiss et al. (2005) e Oliveira et al. (2008) não observaram maior susceptibilidade à infecção de camundongos *knockouts* para IL-1 β e IL-18, ligantes dos receptores acima citados, apesar de maior susceptibilidade dos camundongos MyD88 $-/-$. Adicionalmente, Huang et al. (2003) não observou diferenças da produção *in vitro* de IL-12p40 de células dendríticas estimuladas com HKBA na ausência de IL-1 e IL-18. Contudo, estudos com *B. ovis* são necessários para verificar se a estimulação de tais vias é necessária para imunidade contra esse agente.

4.5 Conclusão

Este trabalho demonstrou que molécula adaptadora MyD88 é importante para o desenvolvimento de resposta inflamatória protetora e melhor eliminação, mesmo que discreta, de *B. ovis* em camundongos e o requerimento dessa molécula é parcialmente dependente de TLR9. Os receptores TLR2 e TLR4 não contribuem para controle da infecção de *B. ovis*.

5. CAPÍTULO II

A proteína TcpB como fator de virulência para *Brucella ovis*

5.1 Introdução

A *Brucella* é um patógeno que possui capacidade de persistir por longos períodos no hospedeiro e causar doença crônica. Esta capacidade está relacionada a alguns mecanismos de virulência da bactéria que a permitem, por exemplo, escapar da fusão do lisossomo e sobreviver multiplicar em compartimentos do retículo endoplasmático (Martirosyan et al., 2011). Estudos demonstraram que a *Brucella* produz uma proteína chamada TcpB que atua ativamente para inibir a sinalização do hospedeiro por via TLR2 e TLR4. Este mecanismo foi descrito em *B. abortus* e *B. melitensis* (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008) e o gene que codifica a TcpB está conservado em *B. ovis* (Tsolis et al., 2009).

Os resultados do capítulo anterior indicaram que as vias de sinalização TLR2 e TLR4 não são importantes para o reconhecimento da *B. ovis* em fase aguda da infecção e isso possivelmente pode ser por interferência da bactéria ao sistema imunológico do hospedeiro. Por isso, neste capítulo resolveu-se investigar se a proteína TcpB é um fator de virulência para *B. ovis*, por meio de deleção do gene que a codifica. Foram realizados estudos *in vivo* e *in vitro* com a bactéria mutante e adicionalmente comparou-se seu comportamento com amostra de *B. abortus* com deleção do gene *tcpB*.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Amostras bacterianas e condições de cultura

Para este trabalho foram utilizadas amostras de *B. ovis* selvagem ATCC 25840 (WT), uma amostra mutante $\Delta tcpB$ de *B. ovis* elaborada neste estudo a partir da amostra virulenta, *B. abortus* 2308 e amostra mutante $\Delta tcpB$ de *B. abortus*. As amostras bacterianas de *B. ovis* foram cultivadas em meio de ágar tríptico de soja (TSA) com

10% de hemoglobina e as amostras de *B. abortus* em meio de TSA, em estufa à 37° C e 5% de CO₂. No meio de cultura utilizado para crescer a amostra mutante foi adicionado 100 µg/ml do antibiótico canamicina. Todos os procedimentos de manipulação com bactérias foram realizadas em laboratório de biossegurança nível 3.

Para a preparação do inóculo, após três dias de crescimento, as colônias bacterianas foram retiradas das placas e feita suspensão em tampão fosfato-salino (PBS). A concentração bacteriana foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Biorad, EUA) em densidade óptica (OD) de 600nm. A concentração final do inóculo foi de aproximadamente 1x10⁶ UFC/animal (unidades formadoras de colônia/animal). O inóculo foi posteriormente plaqueado em placas com TSA com hemoglobina para confirmação da concentração final.

5.2.2 Construção da amostra mutante $\Delta tcpB$ de *B. ovis*.

Para avaliar a participação da proteína homóloga ao TIR na virulência da *B. ovis* em camundongos, foi gerado um mutante através da deleção de gene específico putativo que codifica a proteína homóloga ao TIR, TcpB, conservado na *B. ovis* ATCC25840. A amostra mutante que apresenta deleção deste gene (GenBank BOV0263) foi denominada de $\Delta tcpB$ de *B. ovis*. O plasmídeo utilizado para mutagênese foi gentilmente cedido pelo laboratório da Dra. Renee M. Tsois, *Department Medical Microbiology and Immunology, University of California, Davis, California, USA*. Para a construção do plasmídeo, a sequência do gene *tcpB* localizado no cromossomo 1 de *B. abortus* 2308 (BAB1_0279) e o plasmídeo final foi denominado pBMEI1674.

O plasmídeo foi inserido por eletroporação de *B. ovis* de acordo com protocolo descrito por Silva et al., 2011a. Para tornar a *B. ovis* eletrocompetente, a amostra foi plaqueada em meio TSA com 10% de hemoglobina e mantida por 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As colônias bacterianas foram coletadas e a amostra suspendida em 40 mL de água destilada estéril e divididos em dois tubos falcons de 50 mL mantidos em gelo. A amostra foi centrifugada a 4000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado e o precipitado de bactéria ressuspendido em 20 mL de água estéril gelada. Esse procedimento foi repetido três vezes. Na última lavagem, a suspensão de bactéria foi

transferida para um único tubo, seguida de centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado formado em 1 mL de água estéril.

Para a eletroporação foram adicionados 5 μ L do plasmídeo pBMEI1674 em 55 μ L de suspensão de *B. ovis* eletrocompetente. A solução com 60 μ L foi transferida para uma cubeta estéril (BioRad Laboratories, EUA) e submetida a um choque de 2,2 KV e 5,4 ms, utilizando o equipamento eletroporador da BioRad. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 1 mL de meio SOCB (2% tryptona; 0,5% de extrato de levedura; 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄ 2 mM de glicose), e em seguida, 100 μ L de cada amostra foi plaqueada em meio TSA com hemoglobina sem antibiótico e incubada a 37°C por 16 horas. As colônias crescidas em placa foram raspadas, dissolvidas em 100 μ L de PBS estéril e plaquedas em meio com TSA com hemoglobina e canamicina a 100 μ g/mL (Gibco[®], Invitrogen,SP, Brasil). Adicionalmente, o restante da suspensão foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação e, em seguida, plaqueados 100 μ L e 900 μ L de cada amostra em meio TSA com canamicina. Após incubar as placas por quatro a sete dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂, as colônias foram plaqueadas em linha em meio TSA com canamicina e em meio TSA com ampicilina a 200 μ g/mL (Gibco, Invitrogen, Brasil). Após três dias foram selecionadas colônias que são resistentes à canamicina e sensíveis à ampicilina.

A amostra mutante também foi analisada pela PCR para confirmar a deleção do gene de interesse. Para a extração de DNA, as colônias selecionadas foram ressuspendidas em 100 μ L de água estéril, fervidas por 10 minutos e centrifugadas por 2 minutos a 12.000xg. Para a preparação da PCR foi adicionado 23 μ L de mix PCR comercial (Supermix, Invitrogen, Brasil); 0,5 μ L de primer a 25 μ M; 0,25 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 μ L do DNA extraído. Os primers utilizados estão listados na Tabela 8. A amplificação foi realizada por desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minutos e ao final, extensão a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi corrido em gel de agarose a 1% (Invitrogen).

Tabela 8: Primers utilizados neste estudo

Nome	Sequência alvo (5'-3')	Tamanho do produto
BOV0263 Senso	ATGTCTAAAGAGAAACAAGCCCAATC	933pb
BOV0263 Anti-senso	TCAGATAAGGGAATGCAGTTC	

5.2.3 Curva de crescimento *in vitro*

Para verificar a taxa de crescimento *in vitro* da amostra $\Delta tcpB$ de *B. ovis* foi realizada a curva de crescimento *in vitro*. Para isso, 1×10^3 UFC/ml de *B. ovis* WT e *B. ovis* $\Delta tcpB$ foram plaqueadas em meio de TSA com hemoglobina com ou sem canamicina, respectivamente, em triplicata. Após serem cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, as colônias recuperadas foram ressuspensas em 1mL de PBS e esta suspensão foi submetido a diluição seriada, que posteriormente foi plaqueado em meio de cultivo adequado e cultivado em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 4 a 7 dias. Após esse período foi realizada a contagem de colônias e o valor de UFC/mL foi estimado.

5.2.4 Infecção animal

Para determinar a importância da proteína TcpB para o estabelecimento e persistência da *B. ovis* no modelo murino foi realizada a cinética *in vivo*. Foram utilizados 66 camundongos C57/BL6 machos, com idade entre seis e oito semanas, divididos em três grupos: um grupo infectado com a amostra de *B. ovis* virulenta (n=27), grupo infectado com amostra mutante $\Delta tcpB$ de *B. ovis* (n=27) e um grupo infectado com ambas amostras (n= 12). Aos um, sete e 30 dpi, os animais foram submetidos a eutanásia e submetidos à necropsia com coleta de material conforme descrito no capítulo I.

A partir dos dados de contagem bacteriana dos animais co-infectados foi calculado o índice competitivo pela divisão da taxa de *output* (quantidade de bactéria recuperada), pela taxa de *input* (quantidade de bactéria inoculada). As taxas foram calculadas a partir da seguinte fórmula: UFC da amostra virulenta/UFC amostra mutante.

Adicionalmente foi realizada infecção de camundongos com a amostra mutante $\Delta tcpB$ de *B. abortus*. Camundongos (n=4) foram infectados com a amostra $\Delta tcpB$ de *B. abortus* e com a amostra virulenta *B. abortus* (2308) (n=3) e submetidos a eutanásia após um dia de infecção como descrito anteriormente. Amostras de baço e fígado foram coletadas em PBS estéril para bacteriologia e em formolina tamponada 10% para histopatologia e processados conforme descrito no capítulo 1.

Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA, protocolo 136/08).

5.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Todos os dados em UFC foram transformados para a escala logarítima, as médias calculadas e comparadas pelo teste T de Student (Graphpad Prism 5, USA). Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$. Os dados em porcentagem do peso de baço em relação ao peso vivo e escore de lesão histopatológica de fígado e baço foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney e os valores considerados significativos quando $p < 0,05$ (Graphpad Prism 5, USA)

5.3 Resultados

A proteína TcpB foi descrita em *B. melitensis* e *B. abortus* como um mecanismo de evasão da resposta inata do hospedeiro mediada pelos receptores TLR (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008). O gene que codifica a proteína foi identificado no genoma da *B. ovis* (Tsolis et al., 2009) e por meio de eletroporação, foi substituído por um cassete de resistência ao antibiótico canamicina na amostra mutante *TcpB* de *B. ovis* utilizada no presente estudo. A deleção do gene BOV0263 foi confirmada por seleção de bactérias resistentes a canamicina e por PCR. Como não houve amplificação do gene de interesse na amostra mutante comparada com amostra parental com produto 933pb confirmou-se a deleção.

Com intuito de verificar se a deleção do gene BOV 0263 influenciou o crescimento *in vitro* da bactéria foi realizada a cinética de infecção *in vitro*. Como *B. ovis* não tem crescimento adequado em meio líquido, as amostras $\Delta tcpB$ de *B. ovis* e WT foram plaqueadas em meio sólido de TSA com hemoglobina e as colônias ressuspendidas em PBS e plaqueadas após os períodos de tempo determinados. Nas primeiras 12 horas não foram observadas diferenças em relação ao crescimento das duas amostras. A partir de 24 horas o mutante apresentou um déficit de crescimento de aproximadamente 2 logs UFC/ml em relação à amostra selvagem que persistiu até 72 horas de crescimento *in vitro*. A amostra selvagem entra em fase estacionária a partir de 72 horas, uma vez que após esse período de tempo seu crescimento passa a ser lento. Somente a 96 horas de crescimento, a amostra mutante atingiu valor semelhante à amostra selvagem. Este dados indicam que a amostra $\Delta tcpB$ de *B. ovis* possui um crescimento *in vitro* mais lento quando comparada com a amostra selvagem (Fig.9).

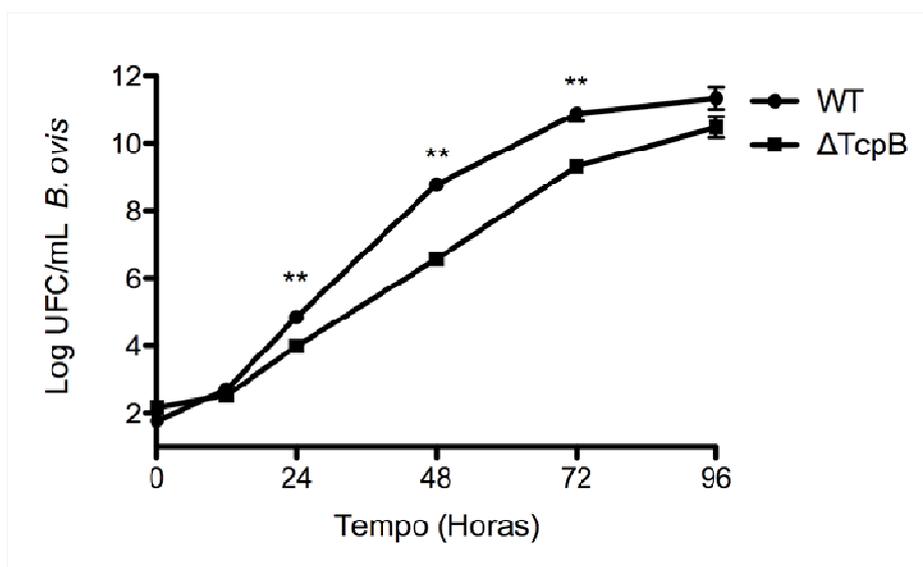


Figura 9: Cinética de infecção *in vitro* das cepas de *Brucella ovis*. Amostras de $\Delta tcpB$ de *B. ovis* e WT cresceram em placas de TSA com 1% de hemoglobina à 37°C e 5% de CO₂. Os dados representam a média e o erro padrão da média de dois experimentos distintos em triplicata. Os dados brutos foram submetidos a transformação logarítmica e analisados pelo teste T de Student. Os asteriscos representam diferença significativa entre grupos em um mesmo tempo de infecção (**p<0,001).

A cinética de infecção *in vivo* demonstrou que a partir do primeiro dia de infecção há recuperação bacteriana significativamente menor (p<0,001) de $\Delta tcpB$ de *B. ovis* quando comparada com a amostra selvagem e a partir de sete dpi colônias de $\Delta tcpB$ não foram

recuperadas em baço e fígado dos camundongos infectados (Fig 10). Aos 30 dpi, houve redução da carga bacteriana da cepa WT e como esperado não houve recuperação do mutante. Esses resultados indicam que a $\Delta tcpB$ não consegue estabelecer a infecção em camundongos. Embora a $\Delta tcpB$ seja recuperada do baço e fígado dos camundongos após um dpi, é menor quando comparada ao WT (diferença de 2,6 logs UFC/g de baço e 3,4 logs/g de fígado). Juntos, esses resultados indicam que o mutante *B. ovis* $\Delta tcpB$ apresenta déficit de crescimento *in vitro* e atenuação em modelo murino.

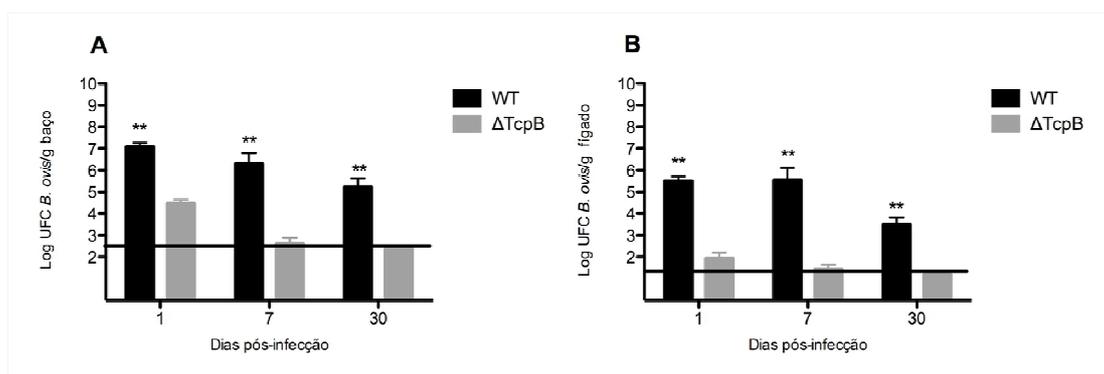


Figura 10: Cinética *in vivo* de infecção da amostra mutante de $\Delta tcpB$ de *Brucella ovis*. Camundongos selvagens foram inoculados via intraperitoneal com aproximadamente 1×10^6 UFC/mL de $\Delta tcpB$ de *B. ovis* ou WT e fragmentos de baço (A) e fígado (B) foram coletados aos um, sete ou 30 dpi para avaliação bacteriológica. As UFC foram submetidas a transformação logarítmica e analisadas pelo teste T de Student. Os dados são representativos de dois experimentos distintos. As barras representam as médias e o erro padrão. Os asteriscos representam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo de infecção ($p < 0,001$). A linha representa o limite de detecção de UFC para cada órgão.

Estes resultados foram surpreendentes, visto que mutantes para *TcpB* de *B. melitensis* e *B. abortus* não apresentaram atenuação no modelo murino em outros estudos (Radhakrishnan et al., 2009; Sengupta et al., 2010). Para verificar se a sequência deletada poderia ter alguma influência na sobrevivência da amostra, foi construído um mutante de *B. abortus* com o mesmo plasmídeo (pBMEI1674) e a amostra mutante foi inoculada em camundongos. Ao contrário do observado com a $\Delta tcpB$ de *B. ovis*, a amostra mutante de *B. abortus* não apresentou atenuação no primeiro dia de infecção comparado com a amostra virulenta de *B. abortus*, indicado pela ausência de diferença significativa entre as quantidades de bactéria recuperadas do baço e fígado dos animais (Fig. 11).

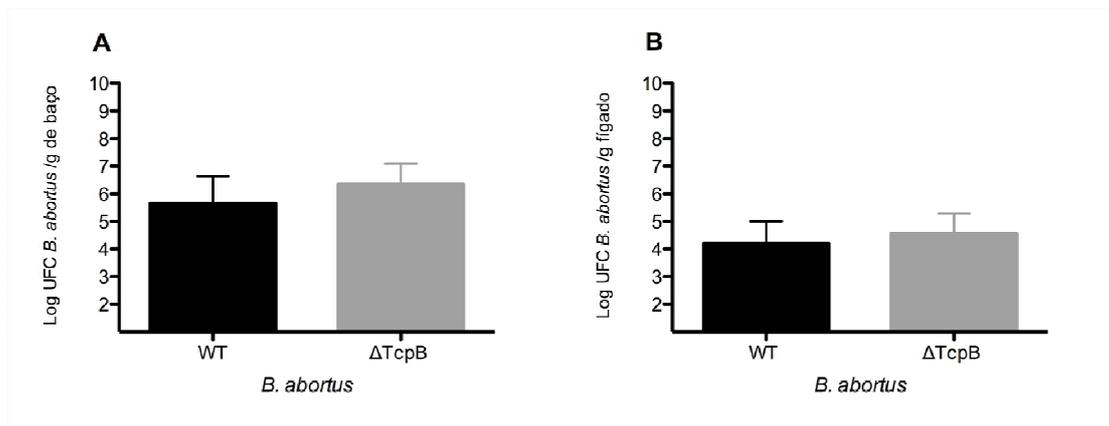


Figura 11: **Infecção de camundongos com a amostra $\Delta tcpB$ de *Brucella abortus***. Camundongos C57/BL6 foram inoculados via intraperitoneal com aproximadamente 1×10^6 UFC/mL de $\Delta tcpB$ de *Brucella abortus* ou *Brucella abortus* 2308 e após 1dpi foram coletadas amostras de baço (A) e fígado (B) para contagem de UFC/g de órgão. As UFC foram submetidas a transformação logarítmica e analisadas pelo teste T de Student. Os dados são representativos de triplicatas de um experimento. As barras representam as médias e o erro padrão.

Adicionalmente, foi realizada co-infecção da amostra selvagem e mutante de *B. ovis* em camundongos para avaliar se o efeito da deleção da *TcpB* poderia ser revertido com a influência dos fatores de virulência sobre o hospedeiro da amostra selvagem e assim, se a amostra mutante poderia sobreviver e multiplicar *in vivo*. Para isso, camundongos foram inoculados com ambas amostras com a proporção de 1:1. Os animais foram submetidos a eutanásia após um, sete e 30 dpi e fragmentos de baço foram coletados para análise bacteriológica e o índice competitivo foi calculado (Fig.12). A recuperação bacteriana da amostra selvagem de *B. ovis* no primeiro dpi foi 2,71 log/g maior que a recuperação da amostra mutante. Nos outros tempos de infecção o valor do índice competitivo foi ainda maior: 5,09 log/g aos sete dpi e 3,78 log/g aos 30 dpi. Estes resultados indicam que não houve sobrevivência da amostra mutante, mesmo com a influência da amostra selvagem sobre o hospedeiro.

Os animais infectados com $\Delta tcpB$ de *B. ovis* não apresentaram esplenomegalia (Tabela 9) ou alterações inflamatórias no baço ou fígado (Tabela 10 e Fig.13B). Este resultado era esperado, uma vez que a amostra mutante não foi capaz de persistir no hospedeiro.

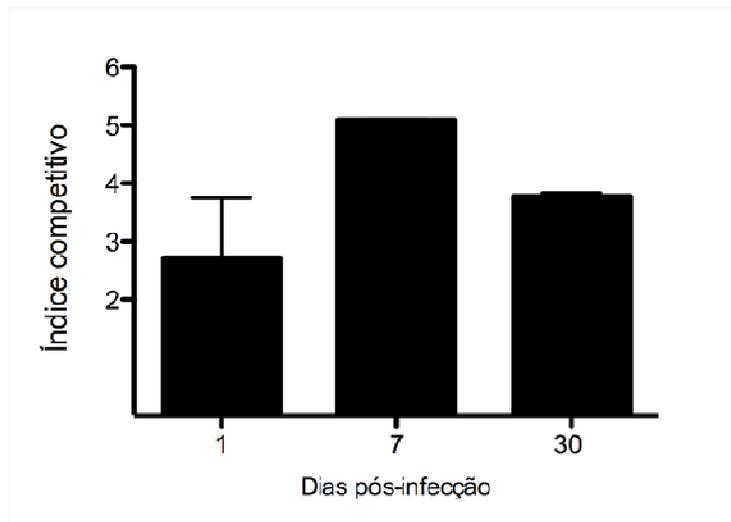


Figura 12: **Índice competitivo (log UFC amostra virulenta/log UFC amostra mutante) de *B. ovis* e $\Delta tcpB$ de *Brucella ovis*.** Camundongos foram infectados com 1×10^6 de ambas amostras via intraperitoneal e submetidos a eutanásia após um (n=4), sete (n=4) e 30 (n=4) dias pós-infecção. Fragmentos de baço foram coletados e submetidos contagem bacteriana. As UFC recuperadas foram normalizadas com cada inóculo e o índice competitivo calculado. As barras representam a média e o erro padrão.

Tabela 9: Peso relativo do baço (%) de camundongos infectados com diferentes amostras de *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção *

<i>B. ovis</i>	1	7	30
WT	0.46	1.85 ^A	1.27 ^A
$\Delta TcpB$	0.43	0.48 ^B	0.31 ^B
Controle Negativo	-	0.41 ^B	-

* Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (P<0,01)

Tabela 10: Escore de lesão para o baço e fígado de animais infectados com diferentes amostras de *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção *

Dias pós infecção	1		7		30	
	Baço ^{**}	Fígado	Baço ^{**}	Fígado	Baço ^{**}	Fígado
WT	0 (n=8)	0 (n=9)	2,00 ^A (n=8)	2,55 ^A (n=9)	1,33 ^A (n=4)	1,55 ^A (n=9)
$\Delta TcpB$	0 (n=9)	0 (n=9)	0,11 ^B (n=9)	0,11 ^B (n=9)	0,11 ^B (n=9)	0,22 ^B (n=9)
Controle negativo	-	-	0 ^B (n=5)	0 ^B (n=5)	-	-

* Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (P<0,01)

** Fragmentos de baço de alguns animais foram perdidos durante o processamento histológico e por isso não foram analisados.

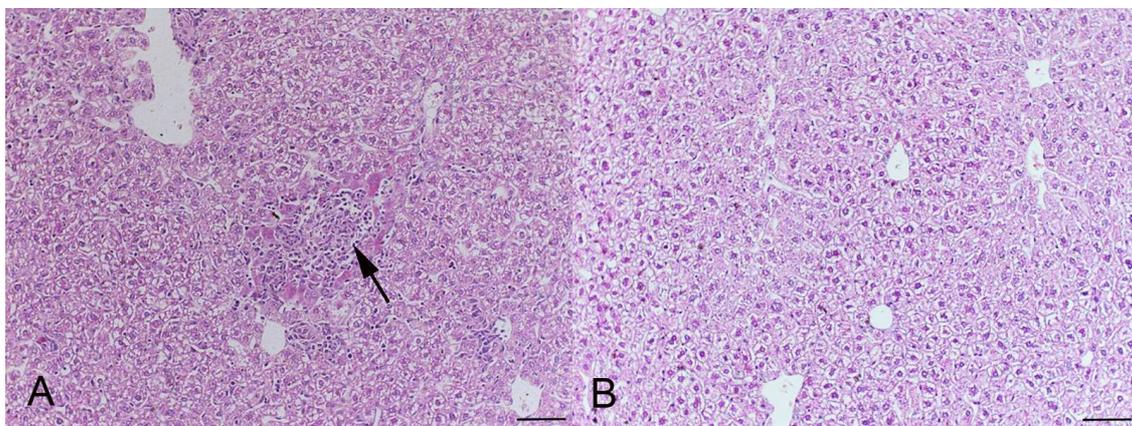


Figura 13: **Histopatologia de fígado de animais infectados com amostra WT e $\Delta tcpB$ de *Brucella ovis*.** (A) Fígado de camundongo infectado com aproximadamente 1×10^6 de *Brucella ovis* WT por 30 dpi. Microgranuloma no parênquima hepático constituído predominantemente por macrófagos e com alguns neutrófilos (seta). HE, barra 100 μ m. (B) Fígado de camundongo infectado com aproximadamente 1×10^6 de $\Delta tcpB$ de *Brucella ovis*. Ausência de lesões inflamatórias no parênquima hepático. HE, barra 100 μ m.

5.4 Discussão

A proteína TcpB foi descrita como um mecanismo de evasão do sistema imunológico inato utilizado pela *Brucella* (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008). Estudos com *B. abortus* e *B. melitensis* indicaram que a TcpB está envolvida em bloquear a sinalização via TLR2 e TLR4 por interagir com proteínas da cascata intracelular de ativação destes receptores que possuem domínios TIR (Salcedo et al., 2008; Radhakrishnan et al., 2009; Sengupta et al., 2010). O gene que codifica esta proteína em *B. ovis* é conservado e neste estudo foi deletado da bactéria por meio de eletroporação. A cinética *in vivo* de infecção demonstrou que esta bactéria mutante possui um fenótipo atenuado a partir do primeiro dia pós-infecção e não consegue colonizar baço e fígado de camundongos. A influência da TcpB funcional não foi capaz de reverter a atenuação do fenótipo da amostra mutante, o que foi observado com a co-infecção. Dessa forma, a ausência de TcpB deve estar relacionada a mecanismos intrínsecos de sobrevivência da bactéria.

Este resultado da infecção de camundongos por $\Delta tcpB$ de *B. ovis* divergiu dos estudos feitos com amostras mutantes de *B. abortus* deficientes de TcpB e que não apresentam deficiência no crescimento *in vivo* a partir da primeira semana de infecção (Sengupta et

al., 2010). A não atenuação a amostra $\Delta tcpB$ de *B. abortus* foi confirmada com infecção de camundongos 1 dpi neste estudo. A perda de um mecanismo de virulência responsável por inibir parte da resposta imunológica inata, a *B. ovis* pode tornar a bactéria mais susceptível aos mecanismos efetores do hospedeiro.

Contudo, após a deleção do gene *tcpB*, a *B. ovis* apresentou um déficit no crescimento *in vitro* e portanto, o fenótipo observado em camundongos pode ser consequência de um crescimento deficiente e não totalmente causado pela ausência do fator de virulência. Em uma pesquisa em banco de dados (NCBI) não foram encontradas proteínas com sequências homólogas à TcpB que estivessem relacionadas à funções metabólicas e de crescimento. Outra possibilidade é *B. ovis* ter sofrido uma mutação espontânea em algum gene que controla o metabolismo e crescimento bacteriano durante a eletroporação. Porém, para verificar esta hipótese são necessários estudos microbiológicos que fogem ao escopo deste trabalho, como por exemplo sequenciamento e complementação.

Estes dados reforçam a ideia de fragilidade genômica da *B. ovis*. O estudo de seu genoma revelou que esta espécie de *Brucella* possui o maior número de pseudogenes dentro do gênero (Tsolis et al., 2009). Alguns estudos demonstraram que a perda de genes de virulência acarretam na incapacidade da bactéria em estabelecer infecção em camundongos. A ausência de um T4SS funcional ocasiona não apenas perda da capacidade de multiplicação intracelular, mas também prejudica o estabelecimento da infecção em camundongos de forma mais marcante quando comparada com amostras mutantes de gene *virB* de *B. abortus* (Sá et al., 2012). Martín-Martín et al. (2012) não conseguiram gerar mutantes de *B. ovis* com deleção do sistema de dois componentes BvrS/BvrR, pois este sistema funcional é necessário para a sobrevivência *in vitro* da bactéria, embora exista mutantes para este gene em *B. abortus* (Sola-Landa et al., 1998; Manterola et al., 2005). Por isso, a perda da TcpB para a *B. ovis* pode ter consequências para o seu crescimento que não são observados em outras bactérias do gênero. Entretanto, apesar dessa fragilidade, a *B. ovis* é uma bactéria bem adaptada ao seu hospedeiro, os ovinos.

5.4 Conclusão

A deleção do gene que codifica a proteína TcpB gerou uma amostra mutante de *B. ovis* incapaz de estabelecer a infecção em camundongos. Esta atenuação pode estar relacionada à perda desse fator de virulência. Contudo, devido ao defeito de crescimento *in vitro* estudos são necessários para caracterizar melhor o seu fenótipo *in vivo* e *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ADACHI, O.; KAWAI, T.; TAKEDA, K.; et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 and IL-18 mediated function. *Immunity*, v. 9, p. 143-150, 1998.

ALBINGER, B.; DAHLBERG, S.; SANDGREN, A.; et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular microbiology*, v.9, p. 633-644, 2007.

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

ARELLANO-REYNOSO, B.; LAPAQUE, N.; SALCEDO, S.; et al. Cyclic 1, 2 β -Glucan is a brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nature immunology*, v. 6, p. 618-625, 2005.

AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ALVES, F.A.S. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Agropecuária Técnica*, v.25, p. 45-50, 2004.

BAGUÉS, N.P.J.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; et al. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: Relationship to virulence. *Infection and immunity*, v. 72, p. 2429-2433, 2004.

BANAI, M.; CORBEL, M. Taxonomy of *Brucella*. *The open veterinary science journal*, v. 4, p. 85-101, 2010.

BANDARA, A.B.; CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ, A.C.; et al. *Brucella suis* urease encoded by *ureI* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC microbiology*, v. 7, p. 57-70, 2007.

BARQUERO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D.S.; et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during onset of infection. *Plos one*, v. 7, p. 1-14 (e631), 2007.

BEHERA, A.K.; HILDEBRAND, E.; BRONSON, R.; et al. MyD88 deficiency results in tissue-specific changes in cytokine induction and inflammation in interleukin-18 independent mice infected with *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*, v. 74, p. 1462-1470, 2006.

BIBERSTEIN, E.L.; MCGOWAN, B.; OLANDER, H.; et al. Epididymitis in Rams. Studies on Pathogenesis. *Cornell Veterinary Journal*, v. 54, p. 27-41, 1963.

BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; et al. The *Brucella suis* *VirB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p.1544-1549, 2002.

BREW, S.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; et al. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *The veterinary record*, v. 144, p. 483, 1999.

BRIONES, G.; INÑÓN de IANNINO, N.; ROSET, M.; et al. *Brucella abortus* cyclic 1, 2 β - Glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infection and immunity*, v. 69, p. 4528-4535, 2001.

BUDDLE, M.B. Studies on *Brucella ovis* (N.SP.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *Journal of hygiene (London)*, v. 54, p. 351-364, 1956.

BUDDLE, M.B.; BOYES, B.W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *The Australian veterinary journal*, p. 145-153, 1953.

BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Veterinary microbiology*, v. 7, p. 551-575, 1982.

BURNE, K.A.; CHEN, Y.Y. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and infection*, v. 2, p. 533-542, 2000.

BURNS, K.; MARTINON, F.; ESSLINGER, C.; et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *The journal of biological chemistry*, v. 273, p. 12203-12209, 1998.

CAMERON, R.D.A.; LAUERMAN, L.H. Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. *The veterinary record*, v. 99, p. 231-233, 1976.

CAMPOS, M.A.; ROSINHA, G.M.S.; ALMEIDA, I.C.; et al. Role of Toll-Like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and immunity*, v. 72, p. 176-186, 2004.

CARPENTER, T.E.; BERRY, S.L.; GLENN, J.S. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: computerized decision-tree analysis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.190, p. 983-987, 1987.

CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; et al. Andrological, pathologic, morphometric and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small ruminant research*, v. 102, p. 213-222, 2011.

CARVALHO, N.B.; OLIVEIRA, F.S.; DURÃES, F.V.; et al. Toll-like receptor 9 is required for full host resistance to *Mycobacterium avium* infection but plays no role in induction of Th1 responses. *Infection and immunity*, v.79, p. 1638-1646, 2011.

CELLI, J.; CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M.; PIZARRO-CERDA, J. MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with endoplasmic reticulum. *The journal of experimental medicine*, v. 198, p. 545-556, 2003.

Censo agropecuário 2006; Minas Gerais. Disponível em www.ibge.gov.br.

CIRL, C.; WIESER, A.; YADAV, M.; et al. Subversion of toll-like receptor signaling by a unique Family of bacterial Toll/interleukin 1 receptor domain-containing proteins. *Nature medicine*, v. 14, p. 339-406, 2008.

CHAIN, P.S.G.; COMERCI, D.J.; TOMALSKY, M.E.; Whole-genome analysis of speciation events in pathogenic Brucellae. *Infection and immunity*, v. 73, p. 8353-8361, 2005.

CHANG, J.S.; RUSSEL, G.C.; JANN, O. et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 127, p. 94-105, 2009.

CHAUDHARY, A.; GANGULY, K.; CABANTOUS, S.; et al. The *Brucella* TIR-like protein TcpB interacts with the death domain of MyD88. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 417, p. 299-304, 2012.

COLLIER, J.E.; MOLELLO, J.A. Comparative distribution of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella ovis* in experimentally infected pregnant sheep. *American journal of veterinary research*, v. 25, p. 930-934, 1964.

COPIN, R.; BAETSELIER, P.D.; CALIER, Y.; et al. MyD88-dependent activation of B220⁻ CD11b⁺ LY-6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *The journal of immunology*, v. 178, p. 5182-5191, 2007.

COPIN, R.; VITRY, M.A.; MAMBRES, D.H.; et al. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistance and susceptible mice. *Plos pathogens*, v. 8, e1002575, 2012.

CORBEL, M.J.; HENDRY, D.M. Urease activity of *Brucella* species. *Research in veterinary science*, v. 38, p. 252-253, 1985.

COSTA, E.A.; SANT'ANNA, F.M.; CARVALHO JR, C.A.; et al. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected

rams in the state of Piauí. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, no prelo.

DAVIDSON, A.L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; et al. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 72, p. 317-364, 2008.

DEN HARTIGH, A.B.; SUN, Y.H.; SONDERVAN, D.; et al. Differential requirements of VirB1 and VirB 2 during *Brucella abortus* infection. *Infection and immunity*, v. 72, p. 5143-5149, 2004.

EISENBERG, T.; HAMANN, H.P.; KAIM, U.; et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, p. 3753-3755, 2012.

EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; MARTIN, B.M.; et al. Characteristics of a *Brucella* species from a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of veterinary investigation*, v. 6, p. 448-452, 1994.

EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; RHYAN, J.C.; et al. *Brucella suis* Biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological and histological study. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, v. 9, p. 417-120, 1997.

FERNANDES, D.M.; BALDWIN, C.L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, v. 63, p. 1130-1133, 1995.

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

FOSTER, G.; JAHANS, K.L.; REID, R.J.; et al. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *The veterinary record*, v. 138, p. 583-586, 1996.

GIAMBARTOLOMEI, H.G.; ZWERDLING, A.; CASSATARO, J.; et al. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the keys mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *The journal of immunology*, v. 173, p. 4635-4642, 2004.

GODFROID, F.; TAMINIAU, B.; DANESE, I.; et al. Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infection and immunity*, v. 66, p. 5485-5493, 1998.

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

GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *The Veterinary record*, v. 144, p. 555-558, 1999.

GUIMARÃES, A. S. *Caracterização da caprinovinocultura em Minas Gerais*. 2006. 98f. Dissertação (Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F. Themes in bacterial pathogenic mechanisms. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; et al. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Oxford: Blackwell publishing, 3 ed, 2008.

HASAN, U.; CHAFFOIS, C.; GAILLARD, C.; et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *The Journal of Immunology*, v. 174, p. 2942-2950, 2005.

HONG, P.C.; TSOLIS, R.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.

HUANG, L.Y.; ALIBERTI, J.; LEIFER, C.A.; et al. Heat-Killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is toll-like receptor 2 dependent. *The journal of immunology*, v. 171, p. 1441-1446, 2003.

HUANG, L.Y.; ISHII, K.J.; AKIRA, S.; et al. Th1-like cytokine induction by Heat-Killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *The journal of immunology*, v. 175, p. 3964-3970, 2005.

HUGHES, K.L.; CLAXTON, P.D. *Brucella ovis* infection: 1. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the Ram. *Australian Veterinary Journal*, v. 44, p. 41-47, 1968.

JUHAS, M.; CROOK, D.W.; HOOD, D.W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular microbiology*, v. 10, p. 2377-2386, 2008.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nature immunology*, v. 11, p. 373-382, 2010.

KIM, S.; WATARAI, M.; SUZUKI, H.; et al. Lipid raft mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microbial pathogens*, v. 37, p. 11-19, 2004.

KHAN, M.M.; CHATTERJEE, S.; DWIVEDI, V.P.; et al. CD4 + T cell derived novel peptide Thp5 induces interleukin 4 production in CD4 + T cells to direct T Helper 2 cell differentiation. *The journal of biological chemistry*, v. 287, p. 2830-2835, 2012.

LACERDA, T.L.S.; CARDOSO, P.G.; ALMEIDA, L.A.; et al. Inactivation of formyltransferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine*, v.28, p. 5627-2634, 2010.

LAPAQUE, N.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as virulence factor. *Current opinion in microbiology*, v. 8, p. 60-66, 2005.

LAPAQUE, N.; MULLER, A.; ALEXOPOULOU, L.; et al. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cellular microbiology*, v. 8, p. 401-413, 2006.

LIBAL, M.C.; KIRKBRIDE, C.A. *Brucella ovis*-induced abortion in ewes. *Journal of American veterinary medical association*, v. 183, p. 553-554, 1983.

LIU, C.; SIMPSON, R.J.; CHEERS, C. Role of IL-6 in activation of T cells for acquired cellular resistance to *Listeria monocytogenes*. *Journal of immunology*, v. 152, p. 5375-5380, 1994.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

MACEDO, G.C.; MAGNANI, D.M.; CARVALHO, N.B; et al. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *The journal of immunology*, v. 180, p. 1080-1087, 2008.

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

MANTEROLA, L.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; et al. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has a higher affinity for bactericidal cationic peptides. *Journal of bacteriology*, v. 187, p. 5631-5639, 2005.

MARCO, J.; GONZALÉZ, L.; CUERVO, L.A.; et al. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *The veterinary record*, v. 135, p. 254-256, 1994.

MARQUES, A.P.R. Caracterização soropidemiológica da infecção por vírus Maedi-Visna e *Brucella ovis* em ovinos no estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2006 (Dissertação, Mestrado).

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

MARTÍN-MARTÍN, A.I.; SANCHO, P.; DE MIGUEL, M.J.; et al. Quorum-sensing and BvrR/BvrS regulation, the type IV secretion system, cyclic glucans, and BacA in the virulence of *Brucella ovis*: similarities to and differences from smooth brucellae. *Infection and immunity*, v. 80, p. 1783-1793, 2012.

MARTINEZ de TEJADA, G.; PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; et al. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and immunity*, v. 63, p. 3054-3061, 1995.

MARTIROSYAN, A.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological reviews*, v. 240, p. 211-234, 2011.

MEINERSHAGEN, W.A.; FRANK, F.W.; WALDHALM, D.G. *Brucella ovis* as cause of abortion in ewes. *American Journal of Veterinary research*, v. 35, p. 723-724, 1974.

MOLELLO, J.A.; FLINT, J.C.; COLLIER, J.R.; et al. Placental pathology. I. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *American journal of veterinary research*, v. 24, p.897-903, 1963.

MORAND-FEHR, P.; BOYAZOGLU, J. Present state and future outlook of the small ruminant sector. *Small Ruminant Research*, v.34, p.175-188, 1999.

MORENO, E.; CLECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary microbiology*, v. 90, p. 209-227, 2002.

MORESCO, E.M.Y.; LAVINE,D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. *Current biology*, v. 21, p. 488-493, 2011.

MUHAMMED, S.I.; LAUERMAN, L.H.; MESFIN, G.M.; et al. Duration of *Brucella ovis* infection in ewes. *Cornell veterinarian journal*, v. 65, p. 221-227, 1975.

MURPHY, E.A.; ASEELAN, J.S.; PARENT, M.A.; et al. 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, 2001.

NOROENI, A.; PORTE, F. Role of cholesterol and the ganglioside GM₁ in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infection and immunity*, v. 70, 1640-1644, 2002.

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

OSTERMAN, B.; MORIYON, I. International committee of systematics of prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 56, p. 1173-1175, 2006.

PAIXÃO, T.A.; ROUX, C.M.; HARTIGH, A.B.; et al. 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.

PIZARRO-CERDÁ, J.; MÉRESSE, S.; PARTON, R.; et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and immunity*, v. 66, p. 5711-5724, 1998.

PLITAS, G.; BURT B.M.; NGUYEN, H.M.; et al. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *The journal of experimental medicine*, v. 205, p. 1277-1283, 2008.

PORTE, F.; NAROENI, A.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of

phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and immunity*, v. 71, p. 1481-1490, 2003.

PRINCE, L.R.; WHYTE, M.K.; SABROE, I.; et al. The role of TLRs in neutrophil activation. *Current opinion in pharmacology*, v. 11, p. 397-403, 2011.

RADHAKRISHNAN, G.K.; YU, Q.; HARMS, J.S.; et al. Brucella TIR domain-containing protein mimics properties of the Toll-like receptor adaptor protein TIRAP. *Journal of biological chemistry*, v. 284, p. 9892-9898, 2009.

RADHAKRISHNAN, G.K.; HARMS, J.S.; SPLITTER, G.A. Modulation of microtubule dynamics by TIR domain protein from the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Biochemical Journal*, v. 439, p. 79-83, 2011.

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

RUIZ, N.; KAHNE, D.; SILHAVY, T. Transport of lipopolysaccharide across the cell: the long road of discovery. *Nature reviews immunology*, v. 7, p. 677-683, 2009.

SÁ, J.C.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; et al. The *virB*-encoded type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice. *Veterinary Microbiology*, no prelo.

SALCEDO, S.P.; MARCHENISI, M.I.; LELOUARD, H.; et al. Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-Containing protein Btp1. *Plos pathogens*, v. 4, p 1-16, 2008.

SANGARI, F.J.; SEOANE, A.; RODRÍGUEZ, M.C.; et al. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infection and immunity*, v. 75, p. 774-780, 2007.

SANTOS, R.L.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.42-56, 2005.

SAUNDERS, B.M.; LIU, Z.; ZHAN, Y.; et al. Interleukin-6 production during chronic experimental infection. *Immunology and cell biology*, v. 71, p. 275-280, 1993.

SCHOLZ, H.C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; et al. *Brucella inopinata* nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systemic and evolutionary microbiology*, v. 60, p. 801-808, 2010.

SENGUPTA, D.; KOBLASNKY, A.; GAINES, J.; et al. Subversion of innate immune response by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *The journal of immunology*, v. 184, p. 956-964, 2010.

SHIN, J.S.; ABRAHAM, S.N. Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes and infection*, v. 3, p. 755-761, 2001.

SILVA, J.B.A.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; et al. Prevalência da brucelose ovina causada por *Brucella ovis* em rebanhos no estado de Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência animal*, v. 13, p. 51-54, 2003.

SILVA, N.S.; BARROS, I.N.; DASSO, M.G.; et al. Detecção de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos do estado da Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 10, p. 852-859, 2009.

SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A. et al. Putative ATP-Binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infection and Immunity*, v. 79, p. 1706-1717, 2011a.

SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; et al. Laboratory animal models for brucellosis research. *Journal of biomedicine and biotechnology*, v. 2011, p.1-9, 2011b.

SIMPLÍCIO, A.A. Caprinocultura e Ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v. 52, p. 27-36, 2011.

SJOLINDER, H.; MOGENSEN, T.H.; KILIAN, M.; et al. Important role of Toll-like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis. *Infection and immunity*, v. 76, p. 5421-5428, 2008.

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

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

TSOLIS, R.M., SECHADRI, R., SANTOS, R.L.; et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One*, v.4, p.1-9 (e5519), 2009.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Toll-like receptors: a central element in innate immune responses. *Infection and immunity*, v. 70, p. 1033-1041, 2002.

VIANA, J.G.A.; SILVEIRA, V.C.P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na metade sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 39, p. 1187-1192, 2009.

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

WATTERS, T.M.; KENNY, E.F.; O'NEILL, L.A.J. Structure, function and regulation of Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunology and cellular biology*, v. 85, p. 411-419, 2007.

WEISS, D.S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; et al. MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, v. 73, p. 5137-5143, 2005.

WESCHE, H.; HENZEL, W.J.; SHILLINGLAW, W.; et al. MyD88: an adaptor that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, v. 7, p. 837-847, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Brucellosis in humans and animals. *Geneva: World Health Organization*, 2006.

XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; et al. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary Microbiology*, v. 145, p. 158-164, 2010.

ZHAN, Y.; KELSO, A.; CHEERS, C. Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Immunology*, v. 80, p. 458-464, 1993a.

ZHAN, Y.; CHEERS, C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and immunity*, v. 61, p. 4899-4901, 1993b.

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.