

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
PATOGENESE DE *BRUCELLA OVIS* EM MODELO MURINO**

TEANE MILAGRES AUGUSTO DA SILVA

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária- UFMG
2010**

Teane Milagres Augusto da Silva

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
PATOGENESE DE *BRUCELLA OVIS* EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada à UFMG, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de Concentração: Patologia Animal

Orientador: Renato de Lima Santos

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2010**

Dissertação defendida em 26 de julho de 2010, pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Renato de Lima Santos
(orientador)

Dra. Reneé M. Tsolis

Prof. Sérgio C. Oliveira

Dr. Andreas J. Bäumlér

Prof. Andrey P. Lage

Dedico à minha família, que
sempre tem me amparado em
todos os momentos da vida.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Todo tempo é bom quando nos ocupamos em superar o que sabemos.”

C. B. González Pecotche

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de desfrutar da vida e de todos os seus momentos especiais.

Ao Prof. Renato, que me orientou desde a graduação com seu grande exemplo como professor e pesquisador, e tem me permitido descobrir a alegria de ser pesquisadora.

À Tatiane e Érica, pela co-orientação e ajuda essencial em todos os momentos do mestrado e durante a realização dos experimentos.

À Dra. Reneé Tsohis, pelo apoio e a grande ajuda na realização do projeto e na discussão dos resultados.

Às colegas e amigas Mariana, Valéria, Tatiane, Érica, Ana Patrícia, Sílvia e Joicy, que me ajudaram a realizar os experimentos e, principalmente, me ensinaram a ser uma pessoa melhor.

À Adriana, pela paciência e o apoio técnico, que foram essenciais durante a realização do experimento.

A todos os professores da Patologia Veterinária, que me ensinaram, com didática e bons exemplos, muitos conceitos além da teoria.

Ao Prof. Andrey e Profa. Rogéria, por gentilmente concederem os materiais para a execução do experimento animal.

Aos amigos da Patologia Veterinária, que foram grandes companheiros durante todo este trajeto.

À minha família, aos amigos e meu amor, pelo apoio, carinho, e estímulo de seguir sempre adiante frente a qualquer dificuldade ou insegurança.

À Escola de Veterinária da UFMG, que permitiu meu crescimento profissional e a oportunidade de conhecer grandes exemplos de professores desde a graduação.

Ao CNPq, por me conceder a bolsa de estudos durante o mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	16
1. O gênero <i>Brucella</i>	16
2. Infecção por <i>Brucella ovis</i>	17
2.1. Patogenia e lesões	18
2.2. Diagnóstico e controle	19
3. Modelos murino de infecção para <i>Brucella</i> spp.	20
3.1. Linhagens de camundongo	20
3.2. Vias de inoculação e dose infectante	22
3.3. Avaliação histopatológica e bacteriológica dos tecidos	23
4. Fatores de virulência da <i>Brucella</i> spp.	24
5. Análise genômica de <i>B. ovis</i>	27
OBJETIVOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	36
(i) Modelo murino de infecção para <i>B. ovis</i>	36
(ii) Mutagênese e identificação de fatores de virulência de <i>B. ovis</i>	43
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagem de bactérias e plasmídeos usados neste estudo	33
Tabela 2. Primers utilizados neste estudo	34
Tabela 3. Escore médio de lesões inflamatórias no baço e fígado de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante a infecção por <i>Brucella ovis</i> .	39
Tabela 4. Escore médio de lesões inflamatórias no baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com amostras mutantes de <i>Brucella ovis</i> .	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da dose de inoculação de <i>Brucella ovis</i> via intraperitoneal em camundongos machos BALB/c. Os valores de UFC recuperados do baço e fígado foram avaliados aos 7 dpi e comparados entre os grupos. Os dados representam média e desvio padrão de grupos de camundongos (n=4) infectados com 4×10^4 , 4×10^5 , 4×10^6 ou 4×10^7 UFC/animal de <i>B. ovis</i> .	36
Figura 2. Cinética de infecção de <i>Brucella ovis</i> em camundongos machos BALB/c e C57BL/6. Cada animal foi inoculado com 1×10^6 UFC de amostra virulenta de <i>B. ovis</i> , via intraperitoneal. Foram avaliados colonização bacteriana aos 1, 7, 30 e 90 dpi no baço (A), fígado (B), testículos (C), epidídimos (D) e vesícula seminal (E). Os dados representam média e desvio padrão de grupos de camundongos (n=4) de um único experimento. A diferença significativa entre as duas linhagens de camundongo está indicada por asteriscos (*p<0,05, **p<0,01). Diferença significativa entre os tempos dentro de uma mesma linhagem está indicada por letras distintas (letras minúsculas-C57BL/6; letras maiúsculas-BALB/c).. Linha horizontal indica o limite de detecção de UFC em cada órgão.	38
Figura 3. Esplenomegalia em camundongos machos durante a infecção por <i>Brucella ovis</i> . (A) Peso do baço em relação ao peso vivo (%) de camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 7,	39

30 e 90 dias após inoculação de 1×10^6 UFC/animal de *B. ovis*. O grupo controle foi inoculado com PBS estéril. A diferença significativa entre grupo infectado e controle está indicada por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (B) Macroscopia de camundongo BALB/c aos 90dpi com evidente esplenomegalia (seta).

Figura 4. Histologia e imunoistoquímica de camundongos machos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Brucella ovis*. (A) Baço de BALB/c aos 30 dpi e (B) fígado de C57BL/6 aos 7 dpi com microgranuloma multifocal, composto predominantemente por macrófagos. Barra: 100 μ m. (C) Epidídimo e (D) vesícula seminal de BALB/c aos 7 dpi, com discreto infiltrado neutrofílico e histiocitário no tecido adjacente. Barra 200 μ m. (E) Imunomarcção de *B. ovis* intralesional em microgranuloma hepático de C57BL/6 aos 7 dpi; Barra 50 μ m (F) Imunomarcção discreta adjacente ao epidídimo associado ao infiltrado inflamatório em BALB/c aos 30 dpi. Barra: 100 μ m. 41

Figura 5. Confirmação de mutagênese de *Brucella ovis* pela PCR. (A) Amplificação de fragmento de 734 pb do operon *virB* presente na amostra virulenta de referência de *B. ovis* (ATCC 25840). No mutante $\Delta virB2$, a inserção do cassete de canamicina resultou na amplificação de um produto maior (1521 pb). (B) Confirmação da deleção dos ORFs BOVA0500/501 (135pb) no mutante ΔABC transportador (ΔABC) e de BOVA0512 (225 pb) no mutante Δ hemaglutinina ($\Delta hemg$) de *B. ovis*. O gene *bscp31* (223pb) foi amplificado como controle interno do gênero *Brucella*. Todos os genes analisados são conservados na amostra de referência de *B. ovis*. (C) Ilustração da deleção e da região amplificada por PCR nos mutantes gerados para a confirmação da mutagênese. 43

Figura 6. Infecção de camundongos machos BALB/c por cepas mutantes de *Brucella ovis*. Colonização bacteriana de amostra virulenta de referência (ATCC 25840) e amostras mutantes de *B. ovis* no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c aos 1, 7, 30 e 90 dpi. Grupos de camundongos (n=4) foram inoculados com 1×10^6 UFC/animal de Δ hemaglutinina, $\Delta virB2$, ΔABC transportador ou da amostra de referência de *B. ovis*. A diferença significativa entre a amostra parental e as amostras mutantes está indicada por asterisco (* $p < 0,001$). Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos avaliados dentro de uma mesma amostra mutante está indicada por letras distintas (letra maiúscula-WT; letra minúscula- Δ hemaglutinina; letra maiúscula itálica- $\Delta virB2$; letra minúscula itálica- ΔABC transportador). A linha horizontal indica o limite de detecção de UFC em cada órgão. 45

Figura 7. Histologia e imunoistoquímica de órgãos de camundongos machos BALB/c infectados com cepas mutantes de *Brucella ovis*. (A) Microgranulomas multifocais moderados no fígado de camundongo BALB/c infectado com a cepa mutante Δ hemaglutinina aos 7 dpi. (B) Discreta imunodeteção intralesional de Δ hemaglutinina em macrófagos associados ao microgranuloma hepático (setas). Barra: 100 μ m. (C-D) 47

Ausência de lesões histopatológicas em camundongos BALB/c infectados com 1×10^6 UFC/animal das cepas mutantes $\Delta virB2$ ou ΔABC transportador. (C) Baço de BALB/c aos 7 dpi infectado com a cepa mutante $\Delta virB2$; (D) Fígado de BALB/c aos 30 dpi infectado com a cepa mutante ΔABC transportador. Barra: 200 μm .

Figura 8. Infecção *in vivo* de macrófago peritoneal com a amostra de referência (ATCC 25840) e cepas mutantes de *B. ovis* em camundongos machos BALB/c. Avaliação da sobrevivência total intracelular (A) e extracelular (B) de WT(●), ΔABC transportador (□) e $\Delta virB2$ (Δ) às 6, 12 e 24 horas após inoculação intraperitoneal de 1×10^6 UFC/animal. (C) Colonização total de baço pela amostra de referência, ΔABC transportador e $\Delta virB2$ às 6, 12 e 24 hpi. Os dados representam média e desvio padrão de grupos de camundongos (n=4) de um único experimento. Diferença significativa entre a amostra de referência e as cepas mutantes está indicada por asteriscos (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). **50**

Figura 9. Sobrevivência de camundongos machos IRF-1^{-/-} infectados com amostra mutante ΔABC transportador ou WT de *Brucella ovis*. Grupos de camundongos (n=5) foram inoculados com $2,3 \times 10^6$ UFC/animal de mutante ΔABC transportador ou amostra de referência de *B. ovis* (ATCC 25840) e monitorados diariamente até 21 dpi. Camundongos IRF-1^{-/-} infectados com ΔABC transportador sobreviveram mais do que camundongos infectados com WT de *B. ovis* (p=0,0079). **51**

RESUMO

Brucella ovis é uma das principais causas de problemas reprodutivos em ovinos. Considerando a escassez de estudos da cinética de infecção por *B. ovis* em camundongos, foi desenvolvido neste estudo um modelo murino de infecção. Camundongos machos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados com 10^6 UFC de *B. ovis*, via intraperitoneal, sendo coletados fragmentos de baço, fígado e trato genital para bacteriologia, histopatologia e imunoistoquímica. Ambas as linhagens apresentaram cinética de infecção similar para *B. ovis*, sendo observados microgranulomas no baço e fígado com discreta imunomarcação de *B. ovis*. A colonização do trato genital foi mínima, com discreta periorquite e periepididimite, não caracterizando tropismo de *B. ovis* pelo trato genital masculino em camundongos. Contudo, o camundongo demonstrou ser bom modelo de infecção para *B. ovis*. Adicionalmente, cepas mutantes foram construídas a partir da deleção de *virB2* (SST4 afuncional), de hemaglutinina ou de ORFs que codificam proteína ABC transportadora. As cepas Δ ABC e Δ *virB2* foram atenuadas no baço e fígado de camundongos em todos os tempos. Contudo, Δ hemaglutinina apresentou colonização similar à amostra virulenta, sugerindo que o gene putativo de hemaglutinina não é essencial para patogênese de *B. ovis*. Adicionalmente, Δ ABC e Δ *virB2* sobreviveram menos do que a cepa parental ($p < 0,01$) em macrófagos peritoneais e no meio extracelular. A virulência de Δ ABC e da cepa parental também foram comparadas em camundongos IRF-1^{-/-} machos. A infecção pela cepa parental resultou em 100% de letalidade em IRF-1^{-/-} até 14 dpi, enquanto a infecção pelo mutante não foi letal. Estes resultados confirmam que SST4 e ABC transportador são essenciais para virulência e sobrevivência *in vivo* de *B. ovis*.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, modelo murino, fatores de virulência, *virB*, ABC transportador.

ABSTRACT

Brucella ovis is one of the main causes of reproductive failure in sheep. Due to the scarcity of studies of *B. ovis* infection in the mouse, a murine model of infection was developed in this study. BALB/c or C57BL/6 male mice were inoculated intraperitoneally with 10^6 CFU of *B. ovis* and fragments of the spleen, liver and genital tract were collected for bacteriology, histopathology and immunohistochemistry. Both mice strains had similar kinetics of *B. ovis* infection and developed microgranulomas in the liver and spleen, with low numbers of intralesional immune-stained *B. ovis*. There was minimal colonization of genital tract in both mice strains, resulting in mild periorchitis or periepididymitis, indicating that *B. ovis* does not have a clear tropism for the genital tract in the mouse. However, the mouse is a suitable infection model for *B. ovis*. Additionally, *B. ovis* mutant strains were generated by deletion of *virB2* gene (nonfunctional T4SS), deletion of putative hemagglutinin or deletion of ORFs encoding an ABC transporter. Δ ABC and Δ *virB2* mutant strains were attenuated for colonization in spleen and liver when compared to the wild type (WT) strain ($p < 0.001$) at all time points. However, Δ hemagglutinin had wild type levels of colonization in the spleen and liver, suggesting that putative hemagglutinin gene is not required for *B. ovis* pathogenesis. Additionally, Δ ABC and Δ *virB2* survive less than WT ($p < 0.01$) in peritoneal macrophages and extracellularly in the peritoneal cavity. Moreover, Δ ABC transporter and WT virulence were compared in IRF-1^{-/-} male mice. WT infection was 100% lethal to IRF-1^{-/-} mice until 14 dpi, whereas Δ ABC transporter was not lethal. These results confirm the requirement of specific ABC transporter and T4SS for full virulence and survival *in vivo* of *B. ovis*.

Key-words: *Brucella ovis*, murine model, virulence factors, *virB*, ABC transporter.

INTRODUÇÃO

A *Brucella ovis* é considerada uma das principais causas de infertilidade em ovinos, com ampla distribuição mundial (Burguess, 1982). A doença é caracterizada por epididimite, orquite e infertilidade em carneiros e, ocasionalmente, aborto em ovelhas (Blasco, 1990), o que resulta em significativa perda econômica para a ovinocultura devido a problemas reprodutivos e descarte precoce dos animais (Carpenter et al., 1987).

A infecção por *B. ovis* pode atingir até 46% dos rebanhos ovinos em regiões de criação intensiva (Sergeant, 1994). No Brasil, os dados epidemiológicos ainda são incompletos, mas foram descritas prevalências de rebanhos positivos de 8,59% e 29,4% em propriedades dos estados da Paraíba e de Minas Gerais, respectivamente (Clementino et al., 2007; Marques, 2006). Contudo, ainda faltam métodos eficientes para o diagnóstico e prevenção da infecção por *B. ovis* no país, uma vez que as provas sorológicas atualmente empregadas têm apresentado resultados variáveis, com elevada frequência de animais falso-negativos (Nozaki et al., 2004). Além disso, a proibição de vacinas produzidas a partir de *Brucella melitensis* (Robinson, 2003) e a ausência de amostras vacinais eficazes têm sido um grande entrave para o amplo controle da doença nos rebanhos ovinos brasileiros.

As dificuldades para estudos experimentais em animais de produção têm levado à procura de alternativas para avaliar a infecção animal e respostas vacinais para *B. ovis* em novos modelos experimentais (Jiménez de Bagüés et al., 1994; Cassataro et al., 2007). O camundongo tem sido o modelo de infecção mais utilizado para o estudo da patogênese da brucelose animal (Enright et al., 1990; Ficht, 2002; Baldwin e Parent, 2002; Ko e Splitter,

2003). Contudo, há escassos trabalhos que avaliam a infecção por *B. ovis* em camundongos (Jimenez de Bagüés et al., 1993). Assim, a caracterização de um novo modelo murino de infecção poderá auxiliar no desenvolvimento de medidas de controle deste patógeno em ovinos (Jimenez de Bagüés et al., 1994; Cassataro et al., 2007).

Já são conhecidos vários mecanismos e fatores de virulência da *Brucella* spp. que são importantes para o estabelecimento da infecção crônica no animal: o sistema de secreção tipo IV (O'Callaghan et al., 1999), sistema regulatório de dois componentes (López-Goñi et al., 2002), cadeia O de lipopolissacarídeo (LPS) (Lapaque et al., 2005), proteínas transportadoras (Rosinha et al., 2002), entre outros. Porém, o estudo de mecanismos exclusivos da *B. ovis* poderá justificar o baixo potencial zoonótico deste organismo, uma vez que é uma das poucas espécies de *Brucella* não patogênica para o homem (Godfroid et al., 2005; Tsolis et al., 2009). Adicionalmente, as características genômicas específicas de *B. ovis* possivelmente determinam o seu forte tropismo para o trato genital masculino de carneiros (Tsolis et al., 2009).

Recentemente, com o sequenciamento completo do genoma da *B. ovis*, foi identificada uma ilha no cromossomo II com 28 ORFs ("open reading frames") exclusivas desta espécie, não sendo encontrados em outras espécies clássicas de *Brucella* (Tsolis et al., 2009). Estes ORFs específicos de *B. ovis* podem presuntivamente codificar proteínas que, possivelmente, estão envolvidas em mecanismos patogênicos da bactéria e que são determinantes para a sua sobrevivência no hospedeiro. O estudo de determinados ORFs através de mutagênese poderá levar à identificação de genes espécie-específicos que desempenham papel na patogênese do

organismo e, conseqüentemente, à geração de amostras atenuadas de *B. ovis*. Portanto, a ampla compreensão da patogênese de *B. ovis* favorecerá o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e, eventualmente, a criação de novas cepas vacinais para o controle eficiente da infecção nos ovinos.

Considerando a escassez de estudos da cinética de infecção por *B. ovis* em camundongos machos e a hipótese de que as seqüências específicas presentes na ilha genômica de *B. ovis* podem codificar importantes fatores de virulência, este trabalho teve como objetivos desenvolver e caracterizar um modelo murino de infecção para *B. ovis* e identificar proteínas codificadas por ORFs específicos que são necessárias para a sobrevivência *in vivo* e patogenicidade da *B. ovis*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. O gênero *Brucella*

Brucelose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Brucella* que acomete animais domésticos e o homem, resultando em impacto sócio-econômico significativo por sua ampla distribuição mundial (Franco et al., 2007). Esta doença tem sido considerada a zoonose bacteriana mais prevalente em todo o mundo, com mais de 500.000 novos casos de infecção humana notificados anualmente, acometendo principalmente países do Mediterrâneo, Ásia Central, Península Arábica, Índia e América Latina (Hartigan, 1997; Franco et al., 2007).

Brucella sp. é um cocobacilo Gram negativo, intracelular facultativo, que possui capacidade de proliferar intracelularmente em células fagocíticas profissionais como macrófagos e em fagócitos não profissionais como trofoblastos (Thoen et al., 1993). No interior da célula no hospedeiro, a *Brucella* sp. tem a

capacidade de alterar a maturação do fagossomo, evitando a fusão com o lisossomo e a degradação bacteriana, possibilitando que a bactéria alcance o seu nicho de replicação intracelular (Gorvel e Moreno, 2002). Este é um dos fatores determinantes para a sobrevivência do organismo no hospedeiro, resultando em infecção crônica e persistente (Thoen et al., 1993; Gorvel e Moreno, 2002). Nas espécies domésticas, a *Brucella* sp. causa alterações reprodutivas como aborto, nascimento de crias fracas, orquite, epididimite e infertilidade, o que resulta em perdas produtivas importantes (Thoen et al., 1993; Silva et al., 2005). Na espécie humana, a brucelose é caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, como febre recorrente, emagrecimento, depressão, meningite, endocardite, espondilite, artrite e, menos comumente, problemas reprodutivos (Hartigan, 1997; Franco et al., 2007; Ko e Splitter, 2007).

O gênero *Brucella* pertence à família α 2-proteobacteriaceae, que é composta por uma diversidade de bactérias que variam desde espécies simbióticas até patógenos extracelulares como *Agrobacterium tumefaciens*, ou intracelular obrigatório como *Rickettsia* sp. (Tsolis, 2002). Considerando as diferenças na patogenicidade, nas características bioquímicas e nos hospedeiros preferenciais, são reconhecidas seis espécies clássicas pertencentes ao gênero *Brucella*: *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. suis* (suínos), *B. abortus* (bovinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos) e *B. neotomae* (ratos do deserto). Com exceção de *B. ovis* e *B. neotomae*, as demais espécies clássicas de *Brucella* são consideradas patogênicas para o homem (Godfroid et al., 2005).

Além das seis espécies descritas, foram isoladas amostras de *Brucella* de mamíferos marinhos, que foram inicialmente classificadas como *B. maris* (Jahans et al., 1997). Posteriormente, uma nova classificação foi

proposta com base nos hospedeiros marinhos, sendo identificadas como *B. pinnipedialis* e *B. ceti* as cepas isoladas de focas e cetáceos, respectivamente (Foster et al., 2007). Contudo, estudos recentes demonstraram diferenças na patogenicidade e sobrevivência intracelular entre os isolados marinhos da mesma espécie, o que poderá resultar na classificação de diferentes patovares dentre as espécies marinhas de *Brucella* (Maquart et al., 2009). Os isolados marinhos de *Brucella* também possuem potencial zoonótico, com um relato de infecção acidental em laboratório (Brew et al., 1999) e dois casos de pacientes naturalmente infectados que apresentaram sinais neurológicos (Sohn et al., 2003).

Recentemente, foram identificadas três novas espécies de *Brucella*: *B. microti* descrita em roedores (Scholz et al., 2008), *B. inopinata* isolada de implante mamário em uma mulher (De et al., 2008; Scholz et al., 2009), e uma nova espécie de *Brucella* isolada de útero de babuínos que foi associada a aborto e que permanece sem classificação definitiva (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009).

Apesar da possibilidade de diferenciar as espécies de *Brucella* através de testes bioquímicos e fenotípicos, a hibridização de DNA demonstrou que o genoma da *Brucella* sp. apresenta similaridade genética maior que 90% entre os membros do gênero (Verger et al., 1998, Moreno et al., 2002). Este dado tem gerado controvérsias quanto à taxonomia do gênero *Brucella*, ao dar suporte à proposição de que todas as amostras seriam biovares da mono-espécie *B. melitensis* (Verger et al., 1985). Contudo, técnicas avançadas de genotipagem têm possibilitado identificar polimorfismos no DNA entre as espécies de *Brucella* (Halling et al., 2005; Foster et al., 2009), favorecendo que a atual classificação taxonômica seja mantida (Moreno et al., 2002; Xavier et al., 2009a).

2. Infecção por *Brucella ovis*

A *Brucella ovis* é uma espécie de *Brucella* naturalmente rugosa, não patogênica para o homem e que causa infecção crônica, clínica ou subclínica em ovinos. A doença é caracterizada por epididimite, orquite e infertilidade nos machos e, ocasionalmente, está associada a aborto em fêmeas (Blasco, 1990; Thoen et al., 1993). Apesar de *B. ovis* ser considerada a principal causa de epididimite em carneiros sexualmente maduros (Ficapal et al., 1998), deve-se ressaltar que outros agentes, como *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni* e *Arcanobacterium pyogenes*, causam lesões e manifestações clínicas semelhantes em ovinos (Walker et al., 1986; Gomes et al., 2001). Carneiros sexualmente maduros são mais susceptíveis do que carneiros jovens à infecção por *B. ovis* (Ficapal et al., 1998), porém, há relatos de infecção em carneiros de até quatro meses de idade (Burguess, 1982) e em rebanhos não utilizados para a reprodução (Bulgin, 1990).

A *B. ovis* foi originalmente identificada na Nova Zelândia na década de 1950 como um agente bacteriano com morfologia de cocobacilo associado a aborto em ovelhas e epididimite em carneiros (McFarlane et al., 1952). Posteriormente, o mesmo agente foi isolado na Austrália (Simmons e Hall, 1953), Estados Unidos (McGowan e Schultz, 1956) e África do Sul (Van Rensburg et al., 1958). Em 1956, o organismo foi caracterizado como uma espécie de *Brucella*, sendo denominado *Brucella ovis* (Buddle, 1956). Desde então, a doença foi identificada em diversos países, inclusive no Brasil (Burguess, 1982; Santos et al., 2005), sendo considerada uma das causas mais importantes de infertilidade em ovinos, com significativo impacto econômico na ovinocultura (Carpenter et al., 1987).

A maioria dos países onde a ovinocultura tem importância econômica, com exceção da Grã-Bretanha (Burguess, 1982), apresenta a infecção por *B. ovis*, que pode atingir até

46,1% dos rebanhos ovinos em regiões de criação intensiva (Sergeant, 1994). No Brasil, um levantamento epidemiológico na Paraíba demonstrou que 8,59% das propriedades apresentaram soroconversão e 5,57% dos reprodutores são acometidos por *B. ovis* (Clementino et al., 2007). No Rio Grande do Sul, a soroprevalência de carneiros de rebanhos positivos varia entre 6,9 a 50%, com elevada soropositividade de animais mais velhos (Magalhães Neto e Gil-Turnes, 1996). Em Minas Gerais, amostras sorológicas coletadas de 12 meso-regiões demonstraram que 5,3% dos ovinos e 29,4% das propriedades são positivos para *B. ovis* (Marques, 2006).

Como outros organismos do gênero, a *B. ovis* é uma bactéria Gram negativa, constituída por uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático e uma membrana externa que contém lipopolissacarídeo (LPS) e diversas proteínas de membrana (Moryon, 1988; Alton et al., 1988). Para o crescimento adequado de *B. ovis*, é necessária a adição de 5% de soro ou sangue no meio de cultura. As colônias são pequenas, imóveis, não apresentam cápsula, não formam endosporos e crescem em meio sólido após 5 a 7 dias de incubação a 37°C em atmosfera com 5 a 10% de CO₂ (Alton et al., 1988). Estas apresentam coloração acinzentada, morfologia circular com aproximadamente 2 mm de diâmetro, superfície brilhante e convexa (Burguess, 1982). Nas provas bioquímicas, a *B. ovis* é catalase positiva, oxidase negativa, não possui atividade de urease, não reduz nitrito a nitrato e nem produz H₂S. Além disso, é positiva no teste de acriflavina e cresce em concentrações-padrão de fucsina e tionina, apesar de não crescer na presença de metil violeta (Alton et al., 1988). Colônias de *B. ovis* são estavelmente rugosas, o que difere das espécies clássicas patogênicas, como *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*, que possuem morfologia lisa, embora *B. canis* seja também

rugosa e tenha potencial patogênico para o homem (Blasco, 1990). A morfologia rugosa se deve à ausência da cadeia O na constituição do LPS (Godfroid et al., 2000).

Em condições naturais, a infecção por *B. ovis* é quase exclusiva da espécie ovina (Santos et al., 2005), no entanto, tem sido demonstrado que caprinos e cervídeos também podem ser infectados. Há descrição de infecção natural de cervídeos *Cervus elaphus* mantidos em contato direto com carneiros infectados (Ridler et al., 2000) e de infecção experimental em caprinos, que foram capazes de eliminar *B. ovis* no sêmen (Burguess et al., 1985). Dentre os animais de laboratório, o camundongo tem sido utilizado como modelo experimental para avaliar respostas vacinais contra *B. ovis* (Jiménez de Bagüés et al., 1993 e 1994; Cassataro et al., 2007). Contudo, ainda há escassos trabalhos que descrevem modelos murino de infecção para esta bactéria (Jiménez de Bagüés et al., 1993).

2.1 Patogenia e lesões

A infecção por *B. ovis* em ovinos pode ocorrer através da mucosa conjuntival, cervico-vaginal, prepucial peniana, retal ou nasal (Burguess, 1982). Ao penetrar na mucosa, o organismo atinge os linfonodos regionais, produz bacteremia, distribui-se para baço, rins, fígado e coloniza os órgãos sexuais aproximadamente 30 dias após a infecção (Biberstein et al., 1964). Ainda não são conhecidos os fatores que determinam o tropismo de *B. ovis* pelo trato genital, porém, sabe-se que não está relacionado ao eritritol (Redwood e Corbel, 1983).

Em carneiros, a infecção por *B. ovis* causa lesões predominantemente na cauda do epidídimo, mas pode se estender para o corpo e cabeça do epidídimo e atingir a ampola do ducto deferente e a vesícula seminal (Searson, 1987). Em infecção experimental de carneiros por via intraepididimária, observa-se intenso

infiltrado local composto por neutrófilos e linfócitos aos quatro dias após inoculação. Posteriormente, o infiltrado se estende para o tecido conjuntivo e epitélio do epidídimo e há acúmulo acentuado de infiltrado neutrofílico no ducto epididimário (Santos et al., 2005). As lesões iniciais progridem para fibrose intersticial e degeneração epididimária com formação de cistos intra-epiteliais, o que pode levar à ruptura do ducto epididimário, extravasamento de espermatozóides para o interstício e à formação de granuloma espermático (Paolicchi, 2001).

Em casos de infecção crônica, o carneiro apresenta degeneração testicular e aumento, frequentemente unilateral, do volume da cauda do epidídimo, que possui consistência firme e coloração esbranquiçada ao corte devido à proliferação de tecido conjuntivo (Blasco, 1990). Microscopicamente, o epidídimo apresenta edema intersticial, fibrose e infiltrado linfo-plasmocitário perivascular. As vesículas seminais podem apresentar aumento de volume com ductos preenchidos por líquido e, histologicamente, apresentam infiltrado inflamatório intersticial (Santos et al., 2005). As glândulas bulbo-uretrais, próstata e ampolas seminais geralmente não apresentam alterações significativas (Foster, 1987).

Em ovelhas, a infecção por *B. ovis* resulta em aborto e nascimento de cordeiros fracos. O aborto em ovelhas gestantes experimentalmente infectadas ocorre em torno de 30 dias após a inoculação e pode chegar a 39% (Meinershagen et al., 1974). Histologicamente, ovelhas gestantes desenvolvem placentite com acentuado infiltrado neutrofílico e fibrinoso na região intercotiledonária e lesões de menor intensidade no placentoma (Libal e Kirkbride, 1983). Além de aborto, a infecção experimental causa até 29% de nascimento de cordeiros fracos ou natimortos (Grilló et al., 1999). Quando a infecção ocorre por via intravaginal durante a cópula, as ovelhas

podem desenvolver vaginite e endometrite, o que leva a retorno do estro e mortalidade embrionária. Neste caso, a *B. ovis* pode ser isolada do trato genital, linfonodos regionais e, menos frequentemente, do baço (Homse et al., 1994). No feto infectado, a única alteração macroscópica observada é peritonite fibrinosa e, na histologia, é descrito infiltrado neutrofílico no pulmão e fígado (Libal e Kirkbride, 1983).

2.2 Diagnóstico e controle

O diagnóstico de brucelose ovina por *B. ovis* baseia-se na associação do exame clínico aos métodos sorológicos e à identificação direta do agente (Burguess, 1982), através de isolamento bacteriano ou detecção de DNA pela técnica de reação de cadeia polimerase (PCR).

Os principais métodos sorológicos utilizados são fixação de complemento, imunodifusão em gel de ágar, e imunoenensaio enzimático (ELISA) indireto (Marín et al., 1989; Vigliocco et al., 1997; Nozaki et al., 2004). O teste de fixação de complemento tem sido o mais empregado, principalmente em países com implantação de programa de erradicação (Robinson, 2003). No entanto, devido às dificuldades existentes na execução do teste e por apresentar sensibilidade semelhante à imunodifusão, a fixação de complemento tem sido amplamente substituída por imunodifusão. Estudos prévios têm demonstrado que o teste de imunodifusão é um método sorológico prático e facilmente aplicável no campo (Myers, 1973; Marín et al., 1989). O teste ELISA também tem sido frequentemente utilizado, ao apresentar elevada sensibilidade e especificidade, o que permite obter resultados mais confiáveis em comparação com os de fixação de complemento e imunodifusão (Vigliocco et al., 1997; Nozaki et al., 2004).

O isolamento de *B. ovis* no sêmen de carneiros permite o diagnóstico definitivo da doença, contudo, o isolamento negativo não descarta a possibilidade de infecção, uma vez que a eliminação da bactéria no sêmen é intermitente (Burguess, 1982). A coleta deve ser realizada com cuidados assépticos, para evitar a contaminação do sêmen com bactérias ambientais e da flora prepucial, pois estas podem inibir o crescimento de *B. ovis* (Brown et al., 1971; Alton et al., 1988). O meio seletivo descrito para o isolamento de *B. ovis* é o meio Thayer-Martin modificado com adição de antibiótico nitrofurantoína e inibidor VCN (vancomicina, colistina e nistatina) (Brown et al., 1971).

A técnica de PCR é um método alternativo rápido e sensível para o diagnóstico de *Brucella* sp., quando comparado ao teste padrão de isolamento bacteriano (Bricker, 2002). O primeiro teste de PCR desenvolvido para o diagnóstico de *B. ovis* em amostras de sêmen de carneiros infectados se baseou na amplificação do elemento de inserção SI771 (Manterola et al., 2003). Contudo, a região alvo é altamente conservada no genoma de todas as espécies de *Brucella*, não sendo um teste específico para *B. ovis* (Halling e Bricker, 1994). Recentemente, foi desenvolvido por Xavier et al. (2010, no prelo) uma PCR de elevada especificidade para a detecção de *B. ovis*, tendo como alvo genes que estão ausentes tanto em outras espécies clássicas de *Brucella* (Tsolis et al., 2009) como em bactérias que potencialmente causam epididimite em ovinos (Xavier et al., 2010, no prelo). A possibilidade de diferenciar a infecção por *B. melitensis* e *B. ovis* em carneiros tem grande importância no âmbito de saúde pública, uma vez que *B. melitensis* é altamente patogênica para o homem (Hartigan, 1997).

A prevenção de *B. ovis* baseia-se na vacinação e na identificação e descarte de animais infectados. A vacinação com amostra de *B.*

ovis associada à *B. abortus* apresenta boa proteção imune. No entanto, esta vacina pode induzir a doença no carneiro e interferir no diagnóstico sorológico do rebanho (Blasco, 1990). Vacinas produzidas a partir de cepa atenuada Rev1 de *B. melitensis* também induzem eficiente resposta imune no animal (Blasco, 1987). No entanto, em países como o Brasil, onde a *B. melitensis* é considerada uma espécie exótica, a utilização destas vacinas é proibida (Robinson, 2003). Portanto, ainda faltam métodos eficientes para o diagnóstico e prevenção de *B. ovis* no país, já que as provas sorológicas atualmente empregadas têm apresentado resultados pouco confiáveis (Nozaki et al., 2004). Além disso, a ausência de uma vacina eficaz e disponível no Brasil é um fator limitante para o amplo controle da doença nos rebanhos ovinos.

3. Modelos murino de infecção para *Brucella* spp.

Atualmente, o camundongo tem sido amplamente utilizado como modelo de infecção para o estudo da patogenia da brucelose animal e humana (Enright et al., 1990; Ficht, 2002; Ko e Splitter, 2003). A utilização do modelo murino associado a técnicas moleculares avançadas tem possibilitado o estudo minucioso da patogênese do agente e da resposta imune dos hospedeiros, o que tem permitido aprimorar as medidas de controle da doença na população humana e animal (Baldwin e Parent, 2002; Ko e Splitter, 2003; Izadjoo et al., 2008). O estudo de modelos murino desenvolvidos para diversas espécies de *Brucella* spp. (Jimenez de Bagués et al., 1993; Izadjoo et al., 2008; Smither et al., 2009; Paixão et al., 2009) tem auxiliado na escolha de fatores importantes, como linhagem de camundongo, dose infectante, via de inoculação e os órgãos avaliados, para a caracterização de novos modelos de infecção em camundongos.

3.1. Linhagens de camundongo

A linhagem de camundongo BALB/c tem sido uma das mais utilizadas como modelo para o estudo de doenças infecciosas, como a brucelose (Enright et al, 1990; Baldwin e Parent, 2002; Kahl-McDonagh et al, 2007). A utilização principalmente de fêmeas não gestantes com 4 a 9 semanas de idade como modelo de infecção tem sido descrita com o objetivo de avaliar a distribuição sistêmica da bactéria em relação ao tempo de infecção (Enright et al, 1990; Stevens et al, 1994; Fernandes et al, 1996). Este modelo tem possibilitado a avaliação da expressão gênica e a consequente atuação das principais citocinas envolvidas na resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro durante a infecção por *Brucella* sp. (Baldwin e Parent, 2002; Ko e Splitter, 2003; Kahl-McDonagh et al, 2007).

Sabe-se que o trato geniturinário masculino das espécies de animais domésticos e de humanos também é alvo de infecção por espécies patogênicas de *Brucella* spp. (Thoen et al, 1993; Silva et al., 2005, Santos et al., 2005). A utilização recente de camundongos BALB/c machos como modelos de infecção permitiu determinar o potencial de patogenicidade de vacinas em machos e no homem, ao avaliar lesões histopatológicas e resposta imunológica do animal frente à aplicação de amostras virulentas e vacinais de *B. melitensis* (Izadjoo et. al., 2008).

Outras linhagens de camundongos utilizadas para estudo de brucelose são C57BL/6 e C57BL/10, que são linhagens mais resistentes à infecção por *Brucella* spp. quando comparadas à linhagem BALB/c (Montaraz e Winter, 1986; Fernandes et al., 1996; Murphy et al., 2001). Um estudo comparativo de ambas as linhagens possibilitou a descoberta de mecanismos eficientes da resposta imune presente em C57BL/6 e C57BL/10 que podem estar comprometidos em linhagens BALB/c e que justificariam a menor susceptibilidade de C57BL à infecção (Fernandes et al., 1996; Murphy et al., 2001; Baldwin e Parent, 2002).

Já foi demonstrado que a linhagem C57BL/10 apresenta menor colonização bacteriana no baço quando comparada à linhagem BALB/c durante a fase de platô da infecção por *Brucella* spp., além de apresentar rápida resolução da infecção (Fernandes et al., 1996). Adicionalmente, grupos de camundongos C57BL/6 infectados com amostra virulenta de *Brucella* sp. apresentam valores de UFC (unidade formadora de colônia), no baço, 10 vezes menor quando comparados ao grupo BALB/c, o que confirma que a linhagem C57BL/6 apresenta maior eficiência no controle da infecção por este agente (Montaraz e Winter, 1986; Murphy et al., 2001).

A disponibilidade de vários camundongos “knockouts” para diversos genes de interesse, produzidos a partir da linhagem C57BL/6 e 129/Sv, tem permitido o estudo do papel de genes específicos na resposta imune eficiente contra *Brucella* spp., sendo que os resultados obtidos neste modelo tende a ter boa correlação com os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro que ocorrem nas espécies de animais domésticos e no homem (Murphy et al., 2001; Baldwin e Parent, 2002; Rolán et al., 2009). Adicionalmente, a utilização de diversos modelos “knockouts” com produção deficiente de citocinas relacionadas à resposta imune inata do animal permite comprovar se estas são determinantes no controle da infecção contra *Brucella* spp. (Fernandes et al., 1996; Murphy et al., 2001; Kim et al., 2005; Ko et al., 2002b).

Para a avaliação da virulência de amostras patogênicas e mutantes de *Brucella* spp., um modelo murino “knockout” para o fator regulador de interferon (IRF) do tipo 1 (IRF-1^{-/-}) foi utilizado (Ko et al., 2002a e 2002b). IRFs são fatores de transcrição induzidos por interferon gama (IFN- γ), que é uma das principais citocinas envolvidas no controle eficiente da infecção por *Brucella* spp. em camundongos (Baldwin e Parent, 2002). Além de apresentarem resposta

imunológica via IFN- γ alterada, camundongos IRF-1^{-/-} são deficientes na indução de óxido nítrico sintetase (iNOS), interleucina 12 (IL-12 40p), e na ativação de células CD8⁺ e “natural killers” (Ko et al., 2002a). Foi demonstrado que o modelo IRF-1^{-/-} morre até duas semanas após a infecção com amostra virulenta de *B. abortus*, porém, a infecção por amostras mutantes atenuadas como RB51 não é letal para o animal (Ko et al., 2002b).

3.2 Vias de inoculação e dose infectante

Em condições naturais, a infecção por *Brucella* spp. pode ocorrer por via inalatória, oral e por contato de mucosa nasal ou conjuntiva com o patógeno (Thoen et al, 1993; Ko e Splitter, 2003). Ao invadir a mucosa, a bactéria é transportada dentro de macrófagos, ou livre na circulação, até atingir os linfonodos regionais. Neste tecido, ocorre intensa proliferação intracelular e dispersão do agente para tecidos linfóides, como linfonodos e baço, além de atingir fígado, glândula mamária e órgãos sexuais (Thoen et al., 1993; Ko e Splitter, 2003; Silva et al., 2005).

A inoculação por via intraperitoneal é tradicionalmente utilizada no modelo murino com o objetivo de favorecer a disseminação sistêmica imediata de *Brucella* spp. e sua proliferação hepática e em tecidos linfóides, principalmente no baço (Stevens et al., 1994; Olsen et al., 2007). A dose de inoculação varia de acordo com a virulência e a cepa de *Brucella* sp. a ser inoculada. Em um estudo com modelo de camundongos BALB/c, a dose inoculada por via intraperitoneal descrita por animal foi de 10⁵ UFC para *B. abortus* 2308 e 10⁷ UFC para *B. abortus* 19 e RB51, o que resultou na colonização bacteriana no baço 10 vezes maior para cepas 2308 e 19, quando comparada à cepa RB51. A resolução da infecção também variou entre as cepas, ocorrendo somente com a cepa RB51, com 6 semanas após a infecção, e a cepa 19, com 20 semanas (Stevens et al, 1994). Jiménez de

Bagüés et al. (1993) descreveram a inoculação de 10⁴ a 10¹⁰ UFC por animal de amostra virulenta de *B. ovis* em camundongos da linhagem CD1, e que doses acima de 10⁷ UFC por animal não resultaram em diferenças na colonização no baço. É importante ressaltar que outros estudos têm demonstrado variações na dose de *Brucella* spp. entre 10³ a 10⁶ UFC por animal, na tentativa de obter colonização bacteriana significativa nos órgãos a serem avaliados (Fernandes et al., 1996; Baldwin e Parent, 2002).

Sabe-se que a infecção natural por *Brucella* sp. em humanos e nos animais domésticos ocorre, principalmente, por via oral (Thoen et al., 1993; Hartigan, 1997; Ko e Splitter, 2007). O uso de modelo murino com inoculação oral de *Brucella* sp. tem permitido o estudo da patogênese da infecção e da resposta imunológica local, já que há indícios de que a proteção em camundongos é otimizada quando se utiliza a mesma via para aplicação do inóculo e da amostra vacinal (Pasquali et al., 2003; Olsen et al., 2007; Izadjoo et al., 2008). A inoculação de 10⁹ a 10¹⁰ UFC de *B. abortus* pela via oral permite a colonização bacteriana no baço com 2 semanas e no fígado com 4 semanas após a infecção. Recentemente, Paixão et al. (2009) descreveram um modelo murino de infecção intragástrico para *B. melitensis* utilizando doses de 10¹⁰ UFC/animal em camundongos BALB/c, o que resultou no estabelecimento da infecção e a distribuição sistêmica da bactéria.

Adicionalmente, a evidência de que a *Brucella* sp. pode ser transmitida inclusive através de aerossóis tem gerado grandes preocupações, já que baixas concentrações deste organismo são suficientes para estabelecer a infecção no homem (Santos et al., 2005; Kahl-McDonagh et al., 2007). Estudos prévios demonstraram a inoculação por via intranasal como forma alternativa de imunização eficiente em camundongos infectados por *B. melitensis* (Mense et al, 2001; Izadjoo et al, 2004). A

dose de inoculação aerógena descrita capaz de resultar em eficiente colonização bacteriana no fígado, baço e pulmão foi de aproximadamente 10^6 UFC para *B. melitensis* e 10^7 UFC para *B. abortus*, contudo, baixas doses como 10^2 a 10^3 UFC por animal são capazes de estabelecer a infecção no camundongo (Olsen et al., 2007; Kahl-McDonagh et al., 2007).

3.3. Avaliação histopatológica e bacteriológica dos tecidos

A virulência da cepa de *Brucella* spp., a dose inoculada e o tempo pós infecção devem ser considerados para a avaliação das lesões histopatológicas descritas em modelos murino de infecção. A associação da avaliação histopatológica com a bacteriologia tem sido bastante utilizada, pois permite correlacionar a concentração bacteriana local com as lesões teciduais existentes e com o curso da infecção (Tobias et al., 1993; Stevens et al., 1994; Kim et al., 2005; Izadjoo et al., 2008).

No modelo murino, o baço é o principal órgão afetado durante a infecção por *Brucella* spp., apresentando elevada colonização bacteriana e lesões histológicas caracterizadas por depleção dos folículos linfóides periarteriolar, associado a infiltrado inicial predominantemente neutrofilico. Com a cronicidade da infecção, os camundongos apresentam infiltrado inflamatório predominantemente histiocitário com formação de microgranulomas (Enright et al., 1990; Tobias et al., 1993; Stevens et al., 1994). Adicionalmente, a esplenomegalia foi considerada significativa em camundongos que receberam elevada dose de inoculação por via aerógena, contudo, esta manifestação clínica tem sido mais evidente quando o organismo é inoculado por via intraperitoneal (Tobias et al., 1993; Kahl-McDonagh et al., 2007).

O fígado também é um órgão alvo para infecção e proliferação de *Brucella* spp. em

camundongos. Este órgão também apresenta elevados valores de UFC, apesar de estes serem menores do que os obtidos no baço do mesmo animal (Enright et al., 1990; Izadjoo et al., 2008; Kahl-McDonagh et al., 2007). Frequentemente, camundongos inoculados com cepas virulentas de *Brucella* spp. apresentam inflamação hepática discreta a moderada, caracterizada por infiltrado neutrofilico e histiocitário com microgranulomas multifocais (Enright et al., 1990; Tobias et al., 1993).

O acometimento do pulmão foi descrito somente em camundongos submetidos à inoculação por via aerógena de cepas patogênicas de *Brucella* sp. No caso do pulmão, não ocorrem alterações histológicas evidentes, apesar de haver significativa colonização bacteriana pulmonar, com contagem bacteriana elevada nas semanas iniciais após a infecção, o que indica a capacidade de multiplicação da *Brucella* sp. neste órgão (Mense et al., 2001; Kahl-McDonagh et al., 2007).

Adicionalmente, alterações histopatológicas e a infecção do sistema reprodutivo têm sido descritas em camundongos. Fêmeas BALB/c gestantes infectadas com *B. abortus* apresentam placentite caracterizada por intenso infiltrado neutrofilico e moderada necrose multifocal a coalescente na zona placentária responsável pela troca metabólica entre o feto e a mãe. Além disso, há presença intracelular da bactéria nas células trofoblásticas, o que foi confirmada por imunoistoquímica. A colonização bacteriana e a severidade das lesões na placenta aumentam com o curso da gestação, o que não ocorre no baço, que mantém colonização bacteriana constante durante o curso da infecção (Tobias et al., 1993; Kim et al., 2005). As lesões descritas na placenta de camundongos são semelhantes às lesões encontradas nos bovinos (Xavier et al., 2009b), o que dá suporte ao uso do modelo murino para estudo da patogênese

da infecção placentária por *B. abortus* (Tobias et al., 1993). Porém, há controvérsias na utilização de camundongos para o estudo da doença em bovino, uma vez que há diferenças entre as espécies quanto ao tipo de placenta.

Na placenta bovina, as células trofoblásticas são células alvo para invasão e multiplicação intracelular de *B. abortus* (Carvalho Neta et al., 2008; Xavier et al., 2009b), ocasionando o aborto no terço final da gestação (Thoen et al., 1993; Silva et al., 2005). Em camundongos BALB/c, Kim et al. (2005) demonstraram a ocorrência de aborto com 4,5 dias de gestação em 98% das fêmeas infectadas com *B. abortus*. No entanto, as células trofoblásticas em placentas tanto de fetos abortados quanto de fetos viáveis apresentaram colonização intracelular bacteriana, além da inoculação do patógeno em diferentes tempos durante a gestação não ser capaz de induzir aborto em camundongos.

Há também evidências de que órgãos reprodutivos masculinos de camundongos são colonizados por *Brucella* sp. e apresentam alterações histopatológicas durante a infecção (Rajashekara et al., 2005; Izadjoo et al., 2008). Camundongos BALB/c machos sexualmente maduros que foram inoculados com cepa virulenta de *B. melitensis* apresentam moderado infiltrado histiocitário perivascular nos testículos associados aos linfonodos inguinais com intensa histiocitose e com perda da arquitetura normal. A colonização bacteriana no trato reprodutivo masculino foi detectada em 22,8% dos animais, porém, de forma intermitente. Além disso, não houve correlação das alterações histopatológicas encontradas no trato reprodutivo e nos linfonodos regionais com os resultados bacteriológicos obtidos do mesmo camundongo (Izadjoo et al., 2008).

Considerando que as alterações patológicas descritas em ovinos durante a infecção por *B. ovis* são, predominantemente, nos órgãos

sexuais de carneiros, seria de grande interesse novos estudos em modelos murino machos. Contudo, há escassos trabalhos que avaliam a cinética de infecção por *B. ovis* em camundongos (Jimenez de Bagués et al., 1993) e não há estudos prévios que avaliam a ocorrência ou não de lesões semelhantes no trato genital masculino de camundongos. Portanto, a caracterização de um novo modelo murino de infecção para *B. ovis* permitirá o estudo da patogênese e auxiliará no desenvolvimento de medidas de controle deste patógeno em ovinos (Jimenez de Bagués et al., 1994; Cassataro et al., 2007).

4. Fatores de virulência da *Brucella* spp.

Os fatores de virulência estão envolvidos na patogenicidade da bactéria, uma vez que determinam a capacidade de invasão, multiplicação e sobrevivência intracelular no hospedeiro. Diferentemente de outras bactérias patogênicas, fatores de virulência clássicos, como fímbrias, flagelos, exotoxina e cápsula não são encontrados em *Brucella* spp. (Gorvel e Moreno, 2002). Contudo, já foram identificados vários fatores patogênicos que são determinantes para a invasão e sobrevivência intracelular da *Brucella* spp., tais como LPS, sistema de dois componentes BvrR:BvrS, sistema de secreção tipo IV e sistema transportador ABC (Gorvel e Moreno, 2002; López-Goñi et al., 2002; Rosinha et al., 2002; Lapaque et al., 2005).

O LPS é um importante componente da membrana externa de bactérias Gram negativas, sendo constituído por lipoproteína A, uma camada de oligossacarídeo e uma cadeia O distal de polissacarídeo. Enquanto as espécies *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* possuem morfologia lisa com todas as camadas intactas, *B. ovis* e *B. canis* são espécies naturalmente rugosas, uma vez que não possuem a cadeia O (Godfroid et al., 2000). O LPS de *Brucella* lisa induz fraca resposta inflamatória, com mínima produção

de citocinas e ativação de complemento quando comparado a outras bactérias patogênicas como *Salmonella enterica* (Barquero-Calvo et al., 2007). Além de favorecer a sobrevivência extracelular, o LPS liso é capaz de atrasar a maturação do fagossomo, inibir a fusão do fago-lisossomo e a apoptose de macrófagos, favorecendo a sobrevivência e replicação intracelular da *Brucella* spp. no hospedeiro (Lapaque et al., 2005). Ao contrário, as amostras mutantes rugosas são atenuadas em macrófagos e em camundongos (Lapaque et al., 2005; Pei et al., 2006). A ausência da cadeia O do LPS resulta em ativação de macrófagos, com produção de TNF- α e óxido nítrico (NO) (Jiménez de Bagüés et al., 2004), e na indução de morte celular de macrófagos (Pei et al., 2006), possivelmente mediada por caspase-2 (Chen e He, 2009).

O sistema regulatório de dois componentes BvrR:BvrS de *Brucella* spp. regula a expressão de genes que codificam proteínas externas de membrana (OMP), que estão relacionadas com a invasão celular do organismo. O sistema é constituído por uma proteína sensorial da superfamília de histidina-quinase (BvrS) e por uma proteína regulatória (BvrR) (López-Goñi et al., 2002), sendo homólogo ao sistema de regulação descrito em outras bactérias como *Agrobacterium tumefaciens* (Guzmán-Verri et al., 2002). Foi demonstrado que amostras mutantes para o sistema BvrR:BvrS não são capazes de recrutar GTPases e polimerizar fibras de actina e, portanto, não conseguem invadir as células do hospedeiro. Além disso, o sistema de dois componentes é importante para a sobrevivência intracelular de *Brucella* spp., uma vez que os mutantes não conseguem escapar da fusão fago-lisossomo (Guzmán-Verri et al., 2002; López-Goñi et al., 2002).

Um dos principais fatores de virulência para a sobrevivência e replicação intracelular de *Brucella* spp. é o sistema de secreção tipo IV

(SST4), codificado pelo operon *virB* que é composto por 12 genes (*virB1* a *virB12*). Os genes *virB1* a *virB11* são conservados, ou seja, apresentam ortólogos nos SST4 de outras bactérias patogênicas, enquanto o gene *virB12* foi identificado somente em bactérias do gênero *Brucella* (O'Callaghan et al., 1999). O SST4 é caracterizado por um complexo proteico presente na membrana externa e é responsável pelo transporte de macromoléculas e DNA bacteriano para o interior das células-alvo (O'Callaghan et al., 1999; Boschioli et al., 2002). Com o estudo da conformação estrutural do sistema VirB em *A. tumefaciens*, foram identificados três grupos funcionais: o pilus na superfície bacteriana (VirB2 e VirB5), um canal proteico transmembrana (VirB3, VirB6-10) e ATPases na membrana citoplasmática (VirB4 e VirB11) (Christie e Vogel, 2000). Em *Brucella* spp., o SST4 possivelmente não está envolvido na translocação de DNA, mas sim, de proteínas efetoras importantes para a manutenção intracelular do organismo no hospedeiro (Boschioli et al., 2002; de Jong et al., 2008).

O SST4 é essencial para o estabelecimento de infecção persistente, pois altera a maturação do vacúolo contendo *Brucella* sp. e inibe a sua fusão com o lisossomo, permitindo que o organismo alcance o retículo endoplasmático e se replique intracelularmente em células fagocíticas profissionais e não fagocíticas (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Celli et al., 2003). Vários estudos têm demonstrado o importante papel do operon *virB* para a sobrevivência e replicação intracelular das espécies patogênicas de *Brucella*, uma vez que todas as amostras geradas através de mutação polar de *virB* foram atenuadas, ao perderem a capacidade de replicar em macrófagos e em células Hela (O'Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Boschioli et al., 2002; Sun et al., 2002; den Hartigh et al., 2004; Rolán e Tsolis, 2007). Além disso, mutantes

virB de *Brucella* sp. não conseguem estabelecer infecção crônica em camundongos, sendo esta controlada possivelmente até 15 dias após inoculação intraperitoneal (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000). Um estudo recente demonstrou que o SST4 de *B. abortus* também está envolvido na formação de microgranulomas no baço de camundongos, uma vez que modelos “knockouts” que apresentam infecção persistente de mutante *virB* não desenvolvem esta lesão (Rolán et al., 2009).

Outro fator de virulência identificado no gênero *Brucella* é o sistema transportador do tipo ABC (“ATP binding cassette”) (Rosinha et al., 2002; Jenner et al., 2009). Em bactérias Gram negativa, este sistema é constituído por: duas proteínas de membrana (permease) com segmentos transmembrana; proteínas periféricas responsáveis pela ligação e hidrólise de ATP; e proteínas periplasmáticas que se ligam a um substrato específico. Apesar dos transportadores serem versáteis, todos são caracterizados pelo transporte transmembrana ativo, sendo necessário obter energia através da hidrólise de ATP (Tam e Saier, 1993). Transportadores ABC são capazes de importar peptídeos, poliaminas, íons, aminoácidos, ferro e sulfatos para o interior da bactéria e exportar antibióticos, ácidos graxos e toxina, além de possuir importante papel na manutenção da expressão gênica e reparo do DNA (Tam e Saier, 1993; Ko e Splitter, 2000).

No gênero *Brucella*, foi demonstrado que um gene específico envolvido no transporte ativo de polissacarídeo é importante para a patogenicidade da bactéria durante a infecção em camundongos. Além disso, a deleção deste gene gerou um mutante atenuado de *B. abortus* com potencial para ser utilizado como amostra vacinal (Rosinha et al., 2002), evidenciando que o sistema ABC pode ser alvo para o desenvolvimento de vacinas (Garmory e Titball, 2004). Contudo, já foram descritos ABC transportadores de *B. abortus*

que não são necessários para a sobrevivência intracelular e infecção crônica em camundongos, apesar de terem funções importantes, como o transporte de ferro (Danese et al., 2004) e a excreção de toxinas (Ko e Splitter, 2000). Recentemente, o estudo das regiões genômicas que codificam ABC transportadores em cinco espécies clássicas de *Brucella* spp. (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ovis* e *B. canis*) resultou na classificação das proteínas em três grupos funcionais: sistema de exportação; sistema de resistência a antibiótico e manutenção; e sistema de importação, no qual se concentra a maioria dos transportadores ABC de *Brucella* spp. (Jenner et al., 2009). Interessantemente, foi demonstrado que aproximadamente 8,8% do genoma da *Brucella* spp. é constituído por genes que codificam ABC transportadores e que estas proteínas, possivelmente, estão relacionadas à capacidade do organismo de sobreviver em condições adversas (Harland et al., 2005; Jenner et al., 2009). Adicionalmente, dentre as espécies de *Brucella* spp. avaliadas, a *B. ovis* codifica o menor número de proteínas transportadoras, uma vez que apresenta 29 pseudogenes no sistema ABC relacionado à importação de nutrientes, sendo incapaz de importar 8 de 26 nutrientes que sabidamente são transportados por este sistema (Jenner et al., 2009).

Outras proteínas que possivelmente estão envolvidas na patogenicidade da *Brucella* spp. são as hemaglutininas presentes na membrana externa (Rocha-Garcia et al., 2002; Perry et al., 2010). Estudos prévios demonstraram a presença de uma proteína na *Brucella* sp. homóloga à proteína de membrana da *Yersinia pestis* e que, em *B. abortus* e *B. melitensis*, é responsável pela adesão e aglutinação de hemácia humana e de animais (Rocha-Garcia et al., 2002). Adicionalmente, a mutação recente do gene putativo para hemaglutinina exclusivo de *B. melitensis* foi capaz de diminuir a ocorrência de aborto no modelo de

infecção em caprinos. Contudo, a colonização bacteriana da amostra mutante foi semelhante à amostra virulenta no baço e linfonodos das cabras, o que demonstra que a hemaglutinina não é essencial para o estabelecimento da infecção no animal (Perry et al., 2010).

5. Análise genômica de *B. ovis*

O genoma de *Brucella* spp. é constituído por dois cromossomos circulares sem plasmídeo e com elevada identidade genética entre as espécies. Os cromossomos se diferem quanto ao tamanho e os genes funcionais, sendo que genes relacionados ao metabolismo e que codificam vias de transporte de nutrientes se concentram no cromossomo I, enquanto genes envolvidos com a síntese de componentes estruturais, transcrição e replicação estão presentes no cromossomo II (Paulsen et al., 2002). As espécies clássicas de *Brucella* possuem valores muito similares de porcentagem G+C (~57,2%), genes por genoma (~ 3460) e de genes que codificam proteínas (~ 3180) (Tsolis et al., 2009; Wattan et al., 2009).

Recentemente, a amostra de referência *B. ovis* ATCC25840 (também conhecida como 63/290 ou NCTC10512), isolada originalmente na Austrália, foi submetida ao sequenciamento completo do genoma (Tsolis et al., 2009), o que resultou na identificação de cromossomo I com 2,1 Mb (Genbank, NC_009505) e cromossomo II com 1,1 Mb (Genbank, NC_009504). A análise genômica de *B. ovis* permitiu estudos comparativos com as espécies patogênicas de *Brucella* previamente sequenciadas, incluindo *B. melitensis* (Delvechio et al., 2002), *B. suis* (Paulsen et al., 2002) e as cepas 9-941 e 2308 de *B. abortus* (Halling et al., 2005; Chain et al., 2005), o que confirmou a elevada conservação genômica do gênero *Brucella*.

No entanto, algumas peculiaridades genômicas da *B. ovis* foram descritas. Diversos genes que

codificam fatores de virulência da *Brucella* sp. estão ausentes na *B. ovis*. Isto se deve à deleção de regiões genômicas ou à presença de genes afuncionais ou pseudogenes (Tsolis et al., 2009). A *B. ovis* possui o maior número de pseudogenes, que representam aproximadamente 11% dos genes que constituem o cromossomo II (Tsolis et al., 2009). Possivelmente, os pseudogenes contribuíram para a variabilidade do grau de patogenicidade e de hospedeiros preferenciais entre as espécies de *Brucella* (Chain et al., 2005). Determinadas características bioquímicas que conferem menor virulência à *B. ovis* estão refletidas no genoma, tais como: a morfologia rugosa da bactéria, devido à ausência dos genes *wboA* e *wboB* que codificam glicosiltransferases e que são essenciais para a biossíntese completa do LPS (Vizcaíno et al., 2004; Tsolis et al., 2009); a incapacidade de utilizar eritritol, ao não expressar genes responsáveis pela sua oxidação e transporte; e o fenótipo de urease negativa, devido à deleção e mutação pontual no operon *ureC1* (Tsolis et al., 2009). Contudo, outras regiões patogênicas estão conservadas no genoma, como o operon *virB* (*virB1-virB12*) com provável SST4 funcional, o sistema regulatório *BvrR:BvrS*, β -glucan cíclico, algumas proteínas transportadoras, entre outras (Tsolis et al., 2009).

O sequenciamento de *B. ovis* também resultou na identificação de uma ilha de 26,5 Kb presente no cromossomo II constituída por 28 ORFs que estão ausentes nas demais espécies clássicas de *Brucella*. Contudo, a mesma ilha genômica foi identificada em três amostras marinhas de *Brucella* isoladas de golfinhos nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*). Na análise de PCR, 17 isolados de *B. ovis* foram positivas para os 12 ORFs avaliados, o que indica a conservação da ilha genômica no cromossomo II entre os isolados de diferentes áreas geográficas (Tsolis et al., 2009). Adicionalmente, análises de PCR confirmaram

que estas sequências alvo estão ausentes em bactérias filogeneticamente próximas à *Brucella* spp. (*Ochrobactrum intermedium* e *Ochrobactrum anthropi*) e em outros organismos que sabidamente causam epididimite em ovinos (*Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Chlamydophila abortus*, *Mannheimia haemolytica* e *Staphylococcus aureus*) (Xavier et al., 2010, no prelo).

Interessantemente, a ilha específica de *B. ovis* está inserida entre duas cópias do elemento SI771, que é altamente conservado no gênero *Brucella* (Halling e Bricker, 1994). Isto sugere duas hipóteses: a região foi deletada nas outras espécies de *Brucella* através de recombinação gênica entre as duas cópias do SI771 ou; a sequência foi adquirida por *B. ovis* com a duplicação do elemento (Tsolis et al., 2009). Também foi demonstrado que nesta ilha genômica são codificadas proteínas específicas de *B. ovis* e potencialmente patogênicas, como proteína ABC transportadora, hemaglutinina putativa, diversas proteínas hipotéticas e possivelmente uma antitoxina que compõe o sistema de toxina-antitoxina bacteriano. Contudo, não se sabe a importância destas proteínas para o estabelecimento da infecção e sobrevivência de *B. ovis* no animal, sendo necessário estudos em modelos animais de infecção.

As análises genômicas de *B. ovis* têm possibilitado a identificação de genes e regiões exclusivas que potencialmente determinam a sua patogenicidade (Tsolis et al., 2009; Wattan et al., 2009). A ampla compreensão da patogênese específica da *B. ovis* auxiliará, portanto, na determinação de fatores que justifiquem o forte tropismo desta espécie para o trato genital masculino de ovino e, ao mesmo tempo, a sua incapacidade de infectar o ser humano (Godfroid et al., 2005; Tsolis et al., 2009). Adicionalmente, estes conhecimentos favorecerão o desenvolvimento

de amostras vacinais para o controle eficiente da *B. ovis* nos ovinos. Portanto, este trabalho objetivou identificar proteínas codificadas por ORFs específicos que são essenciais para a sobrevivência *in vivo* e estão envolvidos na patogenicidade da *B. ovis* durante a infecção animal. Para isso, foi desenvolvido e caracterizado um novo modelo de infecção para *B. ovis* em camundongos machos.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Desenvolver e caracterizar um modelo murino de infecção para *B. ovis*;
- Identificar proteínas codificadas por ORFs específicos que são necessárias para a sobrevivência *in vivo* e patogenicidade da *B. ovis*.

MATERIAL E MÉTODOS

(i) Desenvolvimento de modelo murino de infecção

Preparação de inóculo

A amostra virulenta de *B. ovis* ATCC 25840 (também conhecida como NCTC10512 ou 63/290) foi utilizada neste estudo. Para o preparo do inóculo, a *B. ovis* foi cultivada em placa com meio TSA (Becton-Dickinson, USA) com 10% de hemoglobina (Becton-Dickinson, USA) por 3 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A amostra foi raspada da placa, suspensa em tubo falcon contendo PBS (tampão fosfato salina) estéril, homogeneizada com vórtex, seguida de diluição e leitura no espectrofotômetro com OD₆₀₀ (SmartSpec, BioRad) para estimar a concentração final do inóculo. Foi considerado para *B. ovis* o valor de 1 OD = 2 a 4x10⁹ UFC/ml (Sun et al., 2005). Adicionalmente, o inóculo preparado

foi submetido à diluição seriada em PBS e plaqueadas (100µl) em duplicata em meio TSA com 10% de hemoglobina, para a confirmação da dose de inoculação por animal. Apesar de não ser considerada patogênica ao homem (Godfroid et al., 2005), toda manipulação e cultivo de *B. ovis* foi realizado em laboratório de biossegurança nível 3.

Infecção animal

Considerando a escassez de trabalhos sobre lesões e cinética da infecção por *B. ovis* em camundongos, foram utilizados camundongos machos para caracterizar este modelo de infecção experimental. Os camundongos machos das linhagens BALB/c e C57/BL6 foram adquiridos no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e foram mantidos em fase de adaptação por no mínimo uma semana. Todo experimento animal foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG), protocolo nº 136/08.

Para desenvolver um modelo de infecção para *B. ovis*, inicialmente, foram avaliadas diferentes doses de inoculação. Um experimento piloto utilizando grupos de quatro camundongos BALB/c de 7 a 8 semanas de idade foram inoculados, via intraperitoneal, com 100 µl da amostra virulenta de *B. ovis* nas doses 4×10^5 , 4×10^6 , 4×10^7 e 4×10^8 UFC/ml. Após 1 semana, os animais foram sacrificados com sobredose de xilazina e quetamina e, em seguida, fragmentos de baço e fígado foram coletados para avaliação bacteriológica e histopatológica, como descrito posteriormente.

Após determinar a dose de inoculação a ser utilizado, foi avaliado o curso da infecção de *B. ovis* em duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, que são consideradas linhagens susceptíveis e resistentes à infecção por *Brucella* spp., respectivamente (Baldwin e

Parent, 2002). Um total de 32 camundongos machos BALB/c e C57BL/6 de 7 a 8 semanas de idade (quatro animais por tempo de infecção) foram inoculados, via intraperitoneal, com 100 µl de suspensão contendo $1,3 \times 10^7$ UFC/ml de *B. ovis*. Um grupo controle com quatro camundongos de cada linhagem foi inoculado 100 µl de PBS estéril, via intraperitoneal. Nos tempos 0 (grupo controle), 1, 7, 30 e 90 dias após a infecção, um grupo de cada linhagem foi sacrificado e fragmentos de baço, fígado e trato genital, incluindo ambos os testículos, epidídimos e vesícula seminal, foram coletados para avaliação bacteriológica, histopatológica e imunoistoquímica. Adicionalmente, para avaliar esplenomegalia durante o curso da infecção, cada animal e seu respectivo baço foram pesados, determinando o peso total do baço em relação ao peso vivo do animal.

Bacteriologia

Para a bacteriologia, fragmentos de tecidos foram assepticamente coletados, pesados, transferidos para tubos falcon de 50 ml contendo 2 ml de PBS estéril e macerados com um “mixer” (Hamilton Beach, Washington, USA). Para evitar contaminação entre as amostras, a haste do “mixer” foi lavada duas vezes com água estéril, seguido de álcool absoluto e novamente com água estéril. As amostras foram diluídas em PBS estéril e plaqueadas em meio TSA com 10% de hemoglobina. Após 4 a 7 dias de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂ (Alton et al., 1988), as colônias foram contadas e o valor de UFC por grama de órgão foi estimado.

Histopatologia e Imunoistoquímica

Fragmentos de baço, fígado, testículos, epidídimos e vesícula seminal foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas, seguidos por desidratação em álcool crescente, diafinização em xilol e embebição

em parafina. Os fragmentos foram seccionados em cortes de 5 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica. As lesões inflamatórias foram avaliadas de acordo com intensidade e foi dado um escore para cada tecido, variando de 0 (ausência de lesão) até 3 (lesão acentuada).

Para associar a lesões histopatológicas com a presença intralésional do agente, foi realizada a imunistoquímica dos mesmos tecidos, seguindo o protocolo descrito por Xavier et al. (2009b). Resumidamente, os cortes em lâminas silanizadas foram diafinizados, 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 (25 µg/ml) por 45 minutos, para diminuir marcações inespecíficas no corte. Posteriormente, os cortes foram incubados por 30 minutos com anticorpo primário, utilizando soro diluído (1:5000) de carneiros experimentalmente infectados por *B. ovis* que foram positivos para o teste de imunodifusão em gel-ágar (Xavier et al., 2010, no prelo). 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, EUA). A reação foi revelada com 0,024% de diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) e os cortes contracolorados com hematoxilina de Mayer. Os tecidos foram avaliados quanto à imunodeteção de bactéria e se estas estavam associadas às alterações inflamatórias presentes no tecido.

(ii) Avaliação de genes patogênicos de *Brucella ovis*

Mutagênese de B. ovis

Vários estudos apontam que o operon *virB*, que codifica o sistema de secreção tipo 4 (SST4), é essencial para a sobrevivência *in vivo* e intracelular de diversas espécies de *Brucella* (Sieira et al., 2000; Comerchi et al., 2001; Boschioli et al., 2002; den Hartigh et al., 2004). Considerando estes resultados, foi desenvolvido neste estudo um mutante de *B. ovis* com SST4 afuncional, através da mutação polar do operon *virB2* (mutante TMS1). Adicionalmente, foram gerados dois mutantes (TMS2 e TMS3) através da deleção de genes específicos da ilha patogênica no cromossomo II de *B. ovis*, previamente descrito por Tsolis e colaboradores (2009). O mutante TMS2 apresenta deleção do gene putativo que codifica hemaglutinina (BOVA0512, GenBank), enquanto o mutante TMS3 apresenta deleção de 2 ORFs (BOVA0500 e BOVA0501, GenBank) que, presuntivamente, codificam proteínas constituintes de um sistema transportador do tipo ABC. Os plasmídeos para a mutagênese foram gerados por T. A. Paixão, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Médica da Universidade da Califórnia, Davis, EUA.

Considerando-se que o operon *virB* (*virB1* a *virB12*) é conservado entre *B. ovis* e outras espécies de *Brucella* (Tsolis et al., 2009), para a geração do mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* (TMS1), foi utilizado o plasmídeo pAV2.2 (Tabela 1) desenvolvido previamente por den Hartigh et al. (2004) para a deleção de *virB2* em *B. abortus*. Resumidamente, fragmentos anterior (*virB988-1562*) e posterior (*virB1796-2458*) do gene *virB2* de *B. abortus* foram amplificados por PCR. Os fragmentos foram clonados em pCR2.1 TOPO (Invitrogen, CA, EUA) e, então, o fragmento anterior foi digerido com enzimas *XhoI* e *ClaI* e inserido no pBluescript KS (Stratagene, CA, EUA). O fragmento posterior foi cortado do TOPO através de dupla digestão com enzimas *EcoRI* e *XbaI*, e clonado no mesmo

pBluescript contendo o fragmento anterior. Em seguida, o gene de resistência a canamicina *Tn903* foi amplificado a partir do vetor pUC-KSAC, digerido com *EcoRI* e *ClaI*, e clonado no pBluescript, gerando o plasmídeo pAV2.2 (Tabela 1). Portanto, o vetor utilizado pAV2.2 apresenta o gene *virB2* substituído pelo cassette de resistência a canamicina.

Para a geração do mutante Δ hemaglutinina (TMS2), um fragmento de 1971 pb do gene BOVA0512 de *B. ovis* foi amplificado por PCR, utilizando os primers BOVA0512FW e BOVA0512RV (Tabela 2). O produto foi extraído do gel utilizando kit comercial de extração (QIAEX II, QIAGEN, EUA) e inserido no vetor pCR2.1TOPO-TA, utilizando kit de clonagem TOPO (Invitrogen, CA, USA). O inserto foi retirado do TOPO-TA com dupla digestão, utilizando as enzimas *BamHI* e *XhoI*, e clonado no vetor pBluescript KS. Adicionalmente, o cassette de canamicina KIXX (1,6 kb) foi inserido no meio do inserto no pBluescript KS, a partir da digestão de pUC4-KIXX (Amersham Pharmacia Biotech., EUA) com a enzima *SmaI*, seguida da digestão do vetor pBluescript com enzima *EcoRV*. O plasmídeo final, que possui o gene que codifica a hemaglutinina parcialmente deletado e interrompido pela inserção do cassette KIXX, foi denominado pBO6 (Tabela 1).

Para a geração do mutante Δ ABC transportador (TMS3), os fragmentos anterior (961 pb) e posterior (993 pb) dos ORFs BOVA0500 e BOVA0501 de *B. ovis* foram amplificados por PCR, utilizando os pares de primers BOVA0500FW, BOVA0500RV e BOVA0501FW, BOVA0501RV, respectivamente (Tabela 2). Cada produto foi clonado em pCR2.1 TOPO. O fragmento anterior foi cortado do TOPO-TA utilizando as enzimas *XbaI* e *HindIII* e clonado no pBluescript KS. O fragmento posterior foi cortado através de dupla digestão com *HindIII* e *XhoI* e inserido no mesmo vetor.

Posteriormente, o cassette de canamicina KIXX foi cortado do pUC-KIXX com a enzima *HindIII* e inserido no pBluescript KS entre os fragmentos anterior e posterior. O plasmídeo final com a deleção de dois genes que codificam a proteína ABC transportadora e substituição pelo cassette de canamicina foi denominado pBO4 (Tabela 1).

A sequência e direção 5'-3' correta do inserto dos plasmídeos gerados, pBO4 e pBO6, foram confirmados por sequenciamento. Para a mutagênese de *B. ovis*, cada plasmídeo foi extraído de *E. coli* utilizando o kit de extração Midi-prep (Plasmid Midi Kit, QIAGEN, EUA) e inserido em *B. ovis* por eletroporação, como descrito a seguir.

Eletroporação de B. ovis

A eletroporação de *B. ovis* foi realizada com adaptação do protocolo descrito por Tatum et al. (1992). Inicialmente, para tornar *B. ovis* ATCC25840 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 placas foram raspadas, a amostra foi suspensa em 40 ml meio líquido TSB (*Trypticase Soy Broth*) e dividida em dois tubos falcons de 50 ml, que foram mantidos no gelo. Após centrifugação a 4.000 xg por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, o sobrenadante foi descartado e cada “pellet” de bactéria foi ressuspenso em 20 ml de água estéril gelada, utilizando pipetas de 25 ml geladas. As amostras foram novamente centrifugadas e a lavagem do “pellet” repetida por três vezes. Na última lavagem, a suspensão de bactéria foi transferida para um único tubo, seguida de centrifugação, descarte do sobrenadante e resuspensão do único pellet formado em 1 ml de água estéril. A *B. ovis* eletrocompetente foi mantida no gelo até o momento da eletroporação.

Para a eletroporação, foram adicionados 10 µl de plasmídeos pBO4, pBO6 ou pVA2.2 em 50 µl de suspensão de *B. ovis* eletrocompetente. Cada solução de 60 µl foi transferida para uma cubeta estéril de 0,1 cm (BioRad Laboratories, CA, EUA) e submetida a um choque de 2,2 KV e 5,4 ms, utilizando o equipamento eletroporador da BioRad (BioRad Laboratories, CA, EUA). Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio SOCB (2% tryptona, 0,5% extrato levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose), e em seguida, 100 µl de cada amostra foi plaqueada em meio TSA sem antibiótico e incubada a 37°C por 16 horas. As colônias crescidas em placa foram raspadas, suspensas em 100 µl de PBS estéril e plaqueadas em meio TSA com hemoglobina e canamicina a 100 µg/ml (Gibco®, Invitrogen, Brasil). Adicionalmente, o restante da suspensão foi incubado em “shaker” a 37°C por 16 horas e, em seguida, plaqueados 100 µl e 900 µl de cada amostra em meio TSA com canamicina. Após incubar as placas por 4 a 7 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂, as colônias crescidas foram plaqueadas em linha em meio TSA com canamicina e em meio TSA com ampicilina a 200 µg/ml (Gibco®, Invitrogen, Brasil). Após 4 a 7 dias, foram selecionadas colônias de cada mutante que eram resistentes à canamicina e sensíveis à ampicilina.

Confirmação de mutagênese por PCR

Para a confirmação dos mutantes gerados, além da seleção pela resistência ao antibiótico, cada mutante foi analisado pela PCR, utilizando primers específicos de *B. ovis* para a confirmação da deleção dos genes de interesse. Para a extração de DNA, as colônias selecionadas foram ressuspensas em 100 µl de água estéril, fervidas por 10 minutos e centrifugadas por 2 minutos a 12.000 xg. A

preparação da reação para PCR foi padronizada para todos os mutantes, sendo adicionado 23 µL de mix de PCR comercial (Supermix, Invitrogen, SP, Brasil), 0,5 µL de cada primer a 25 µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, SP, Brasil) e 2 µL do sobrenadante do DNA extraído. Os parâmetros utilizados para a amplificação foram: 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 minuto e, ao final, extensão a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi corrido em gel de agarose a 1% com brometo de etídio (Invitrogen, SP, Brasil).

Para confirmar o mutante $\Delta virB2$ (TMS1), foram utilizados os primers virB-FW e virB-RV (Tabela 2), sendo esperado um produto de maior peso molecular para amostras mutantes (1521 pb) do que para a amostra WT de *B. ovis* (734 pb), considerando que no mutante houve a inserção do cassete de canamicina na região alvo de amplificação. Para a confirmação dos mutantes ΔABC transportador (TMS3) e Δ hemaglutinina (TMS2), foram utilizados os pares de primers BO4FW, BO4RV e BO6FW, BO6RV, respectivamente (Tabela 2), descritos por Tsolis et al., 2009). Em ambos os mutantes, o alvo de amplificação foi a região deletada, portanto, as colônias consideradas mutantes eram negativas na PCR. Adicionalmente, como um controle interno para as amostras mutantes de *B. ovis*, foram utilizados os primers BrucellaP31-FW e BrucellaP31-RV descritos por Baily et al. (1992) para a amplificação do gene *bcs31*, que codifica uma proteína de superfície celular altamente conservada no gênero *Brucella*. Como controle positivo das reações, foi utilizada colônia fervida de *B. ovis* ATCC25840, sendo

esperado um produto de 135 pb, 225 pb e 223 pb para os primers BO4, BO6 e BrucellaP31, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1. Linhagens de bactérias e plasmídeos usados neste estudo

	Nome	Descrição	Referência/ Fabricante
Bactérias	WT	amostra virulenta de <i>B. ovis</i>	ATCC25840
	TMS1 ($\Delta virB2$)	<i>B. ovis</i> $\Delta virB2::kan^R$	este estudo
	TMS2 (ΔABC trans.)	<i>B. ovis</i> $\Delta BOV2_500-501::kan^R$	este estudo
	TMS3 ($\Delta hemag.$)	<i>B. ovis</i> $\Delta BOV2_512::kan^R$	este estudo
	XL1 Blue	<i>E. coli</i> usado para clonagem	Phonectria
	DH5 α	<i>E. coli</i> usado para clonagem	Phonectria
Plasmídeos	pUC4-KIXX	plasmídeo com cassete de kanamicina (1.6kb)	Amersham PharBio.
	pBluescript KS	Vetor para clonagem	Stratagene
	pCRI1.TOPO-TA	Vetor para clonagem	Invitrogen
	pVA2.2	Fragmentos de <i>B. abortus virB988-1562</i> e <i>virB1796-2458</i> com cassete KSAC inseridos no pBluescript KS	den Hartigh et al, 2004
	pBO4	Fragmentos BOVII 518658-519618 e BOVII 521570-522550 com cassete KIXX inseridos no pBluescript KS	este estudo
	pBO6	Fragmento BOVII 530959-532701 com cassete KIXX inseridos no pBluescript KS	este estudo

Tabela 2. Primers utilizados neste estudo.

Nome	Sequência (5' - 3')	Enzima de restrição*	Tamanho do produto
BOVA0500FW	<u>TCTAGAC</u> CATATGTGCCAGCATCAC	<u>Xba I</u>	961pb
BOVA0500RV	AAGCTT <u>GATTT</u> CGAGTAATAGACC	<u>Hind III</u>	
BOVA0501FW	<u>AAGCTT</u> CACTCATATCTTGC GG GT	<u>Hind III</u>	993pb
BOVA0501RV	CTCGAGGGGCTTGGCTCTTTGCTGA	<u>Xho I</u>	
BOVA0512FW	<u>GGATCCT</u> CATAGCTCAATGCCGTT	<u>BamH I</u>	1971pb
BOVA0512RV	CTCGAGTGCAGCTGGAGGCTGTACA	<u>Xho I</u>	
virB-FW	CAGGATGCGCTCTAACACAA	-	1521pb (TMS1)
virB-RV	TACGATCAGCGGCAATATGA	-	734pb (WT)
BO4-FW	TGGTATCTTCAGCCGTTCCAAG	-	Neg (TMS3)
BO4-RV	ATCTTTGCCCGTTCCAGTCG	-	135pb (WT)
BO6-FW	TTCAGGCGACTGCTAATGGCAC	-	Neg (TMS2)
BO6-RV	AAACCGATACCTCATCCCCGAG	-	225 pb (WT)
BrucellaP31-FW.	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	-	223pb
BrucellaP31-FW.	CGCGCTTGCCTTTCAAGTCTG	-	

*Enzimas de restrição estão sublinhadas no primers.

Neg- amostra negativa; TMS1- Δ virB2; TMS2- Δ hemaglutinina; TMS3- Δ ABC transportador; WT- *B. ovis* ATCC25840

Infecção de camundongos

Para comparar a cinética de infecção *in vivo* dos mutantes com amostra virulenta (WT) de *B. ovis*, grupos de quatro ou oito camundongos machos BALB/c de 7 a 9 semanas de idade foram inoculados 100 μ l de solução com aproximadamente 1×10^7 UFC/ml de amostras Δ virB2 (TMS1), Δ hemaglutinina (TMS2), Δ ABC transportador (TMS3) ou amostra virulenta de *B. ovis*. Nos tempos 1, 7, 30 e 90 dias pós infecção, um grupo de cada amostra foi sacrificado, sendo coletados fragmentos de baço e fígado para avaliação bacteriológica, histopatológica e imunoistoquímica, como descrito anteriormente. Para a bacteriologia, os tecidos de animais infectados com amostra

mutante foram plaqueados em meio TSA com hemoglobina e 100 μ g/ml de canamicina. Tecidos de animais infectados com amostra virulenta foram plaqueados em meio TSA com hemoglobina sem antibiótico.

Adicionalmente, a virulência do mutante Δ ABC transportador foi comparada com a amostra virulenta de *B. ovis*, através da avaliação de letalidade em modelos de camundongos 129/Sv “knockout” para o fator regulador de IFN ($IRF-1^{-/-}$). Camundongos $IRF-1^{-/-}$ apresentam resposta imunológica alterada via sinalização de IFN- γ , o que impede o controle eficiente da infecção por *Brucella* spp. (Ko et al., 2002a). Estes animais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio

Costa Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG. Grupos de 5 camundongos machos de 7 a 12 semanas de idade foram inoculados com 100 µl de $2,3 \times 10^7$ UFC/ml de WT ou mutante ΔABC transportador de *B. ovis*, via intraperitoneal. Todos os animais inoculados foram mantidos em caixas isoladas e a sobrevivência nos dois grupos foi monitorada diariamente até 21 dias pós infecção.

Infecção in vivo de macrófago peritoneal

Com o objetivo de comparar a cinética inicial da infecção intraperitoneal entre a amostra WT e mutantes atenuados de *B. ovis*, foram avaliadas a infecção de macrófagos peritoneal *in vivo* em camundongos e a capacidade de distribuição sistêmica da amostra inoculada até 24 horas pós inoculação. Grupos de quatro camundongos BALB/c machos de 7 a 8 semanas de idade foram inoculados com 100 µl de aproximadamente 1×10^7 UFC/ml de $\Delta virB2$, ΔABC transportador ou amostra WT de *B. ovis*, via intraperitoneal. Nos tempos 6, 12 e 24 horas pós infecção, um grupo de cada mutante e de amostra WT foi sacrificado por deslocamento cervical e os macrófagos peritoneal foram recuperados, seguindo o protocolo descrito por Zhang et al. (2008). Resumidamente, foi injetado vigorosamente 10 ml de PBS Dulbecco estéril gelado na cavidade peritoneal de cada animal, utilizando uma seringa de 10 ml e agulha 20G. Em seguida, a solução foi imediatamente aspirada com a mesma seringa e o volume total recuperado transferido para tubo falcon de 15 ml mantido em gelo. Uma alíquota da solução foi submetida à diluição seriada em água estéril e plaqueada em meio TSA com ou sem antibiótico, para estimar o valor de UFC total (intracelular e extracelular) na cavidade peritoneal. Posteriormente, a solução recuperada foi centrifugada a 400 xg por 10 min em centrífuga refrigerada a 4°C seguida de descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet de macrófagos peritoneal em 500 µl de

RPMI (Gibco, Invitrogen, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/ml de gentamicina (Invitrogen, Brasil), para matar bactéria extracelular. As amostras foram mantidas em estufa a 37°C por 1 hora, centrifugadas e descartado o sobrenadante. Os macrófagos foram delicadamente lavados com 1 ml de solução de RPMI sem antibiótico, seguida de nova centrifugação e adição de 300 µl de solução de Triton-X (Nucelar, SP, Brasil) a 0,01%. As amostras foram homogeneizadas vigorosamente utilizando vórtex, lavadas com 700 µl de PBS estéril, diluídas e plaqueadas em meio TSA com ou sem antibiótico. As placas foram incubadas em estufa por 4 a 7 dias e o valor de UFC intracelular por animal foi estimado. Adicionalmente, o baço de cada animal foi coletado e processado para bacteriologia, como previamente descrito, para avaliar a colonização total no baço após 6, 12 e 24 horas de infecção.

Análise estatística

Todos os dados em UFC sofreram transformação logarítmica e foram submetidos a ANOVA. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey (GraphPad InStat3, USA) e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. A splenomegalia foi avaliada por ANOVA. A média de escores para lesões histopatológicas foram comparadas com o teste não paramétrico Kruskal Wallis (GraphPad InStat3, USA). A frequência de letalidade entre os grupos de camundongos IRF-1^{-/-} foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher (GraphPad InStat3, USA), sendo valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.

RESULTADOS

Modelo murino de infecção para *B. ovis*

Com o objetivo de avaliar a cinética da infecção por *B. ovis* em camundongos machos, inicialmente, foi realizado um experimento piloto para determinar a dose mínima de inoculação intraperitoneal capaz de resultar em infecção, verificada pela colonização bacteriana do baço e fígado. Entre as quatro doses avaliadas (4×10^4 , 4×10^5 , 4×10^6 e 4×10^7 UFC/ animal) em camundongos machos

BALB/c, não houve diferença significativa ao comparar os valores de UFC do baço e fígado aos 7 dias pós infecção (dpi) (Figura 1). Camundongos inoculados com doses maiores ou iguais a 4×10^5 UFC/animal apresentaram colonização bacteriana elevada no baço e fígado (aproximadamente 10^7 UFC/ órgão). Considerando que o grupo inoculado com 4×10^6 UFC de *B. ovis* por animal apresentou menor variação dos valores de UFC, este inóculo foi utilizado como padrão para todos os experimentos seguintes.

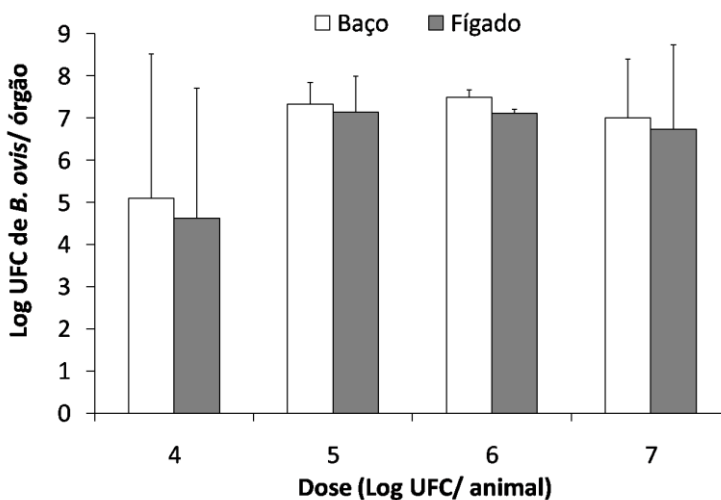


Figura 1: Avaliação da dose de inoculação de *Brucella ovis* via intraperitoneal em camundongos machos BALB/c. Os valores de UFC recuperados do baço e fígado foram avaliados aos 7 dpi e comparados entre os grupos. Os dados representam média e desvio padrão de um único experimento de camundongos (n=4) infectados com 4×10^4 , 4×10^5 , 4×10^6 ou 4×10^7 UFC/animal de *B. ovis*.

Em seguida, para caracterizar um modelo murino de infecção, grupos (n=4) de camundongos machos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados com $1,3 \times 10^6$ UFC de *B. ovis* por animal e sacrificados aos 1, 7, 30 e 90 dpi. Os resultados bacteriológicos de baço, fígado, testículos, epidídimos e vesícula seminal estão representados na Figura 2. No baço, foi demonstrado que ambas as linhagens apresentaram elevada colonização bacteriana

com 1 e 7 dpi, seguida por diminuição significativa dos valores de UFC a partir de 30 dpi (Figura 2A). A linhagem BALB/c apresentou aumento significativo da colonização esplênica de 1 para 7 dpi, o que não ocorreu em camundongos C57BL/6. Além disso, camundongos BALB/c demonstraram valores de UFC no baço maiores do que C57BL/6 aos 7 (p<0,05) e 30 dpi (p<0,01) (Figura 2A), o que demonstra, inicialmente, maior susceptibilidade desta linhagem à

infecção por *B. ovis*. A colonização bacteriana no fígado, quando comparada ao baço, foi menor durante todo o curso da infecção em ambas as linhagens de camundongos (Figura 2B). No entanto, a cinética de infecção encontrada no fígado foi similar à descrita no baço, com diminuição da colonização a partir de 30 dpi. Interessantemente, os valores de UFC no fígado de BALB/c e C57BL/6 foram semelhantes aos 1, 7 e 30 dpi, sendo a colonização maior em camundongos BALB/c somente aos 90 dpi ($p < 0,05$).

Adicionalmente, a esplenomegalia foi avaliada nos camundongos BALB/c e C57BL/6, ao comparar o peso de baço/peso corporal do grupo controle com os grupos infectados com *B. ovis* (Figura 3A). O peso de baço foi significativamente maior aos 7 e 30 dpi tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6. No entanto, a esplenomegalia foi mais evidente em camundongos BALB/c, que apresentou esta alteração até 90 dpi, como demonstrada na Figura 3B.

Ao avaliar o trato genital masculino, os valores de UFC de *B. ovis* recuperados de testículos, epidídimos e vesícula seminal no início da infecção foram semelhantes tanto em camundongos BALB/c como em C57BL/6 (Figura 2C-E). Camundongos C57BL/6 apresentaram diminuição da colonização no trato genital a partir de 30 dpi, sendo recuperados valores mínimos de UFC no testículos e na vesícula seminal. Em camundongos BALB/c, houve diminuição significativa da colonização aos 30 dpi somente nos testículos (Figura 2C). Epidídimos e vesícula seminal de BALB/c apresentaram oscilações dos valores de UFC durante o curso da infecção (Figura 2D,E). Na vesícula seminal de BALB/c, não foi observada diferença significativa de colonização entre os tempos avaliados devido à grande variação no valor de UFC entre os grupos (Figura 2E). Os dados bacteriológicos demonstram que a infecção por *B. ovis* não

persiste no trato genital de camundongos machos.

Para identificar as lesões inflamatórias que estão relacionadas à infecção por *B. ovis* no camundongo, fragmentos de baço, fígado, testículos, epidídimos e vesícula seminal foram coletados aos 1, 7, 30 e 90 dpi, avaliados histologicamente e por imunodeteção de bactéria intralésional. Como grupo controle, camundongos machos BALB/c ($n=4$) e C57BL/6 ($n=4$) foram inoculados com PBS estéril e sacrificados no dia da inoculação (tempo 0). Nenhum dos animais apresentou alteração inflamatória nos órgãos avaliados, sendo estes utilizados como controle negativo para histologia e imunoistoquímica.

No baço, as alterações histológicas foram caracterizadas por microgranulomas multifocais, discretos a moderados, adjacentes à polpa branca, que foram observados a partir de 7 dpi tanto em BALB/c quanto em C57BL/6 (Figura 4A). No fígado, todos os camundongos aos 7 e 30 dpi apresentaram microgranulomas hepáticos multifocais, discretos a moderados, caracterizados por infiltrado inflamatório predominantemente histiocítico, contendo macrófagos epitelióides (Figura 4B). A média de escores das lesões no baço e no fígado de camundongos BALB/c e C57BL/6 para os diferentes tempos avaliados está descrita na Tabela 3. Os escores para o fígado foram similares entre ambas as linhagens em todos os tempos avaliados, enquanto no baço as lesões foram mais acentuadas na linhagem BALB/c somente aos 7 dpi. Na fase aguda da infecção (1 dpi), as alterações histológicas foram raras ou ausentes, apesar destes animais apresentarem elevado valores de UFC no baço e fígado. No entanto, o escore médio de lesão foi maior aos 7 e 30 dpi em ambas as linhagens, o que demonstra que as lesões inflamatórias nos camundongos são mais evidentes durante a

fase crônica da infecção associada à elevada

colonização bacteriana dos órgãos.

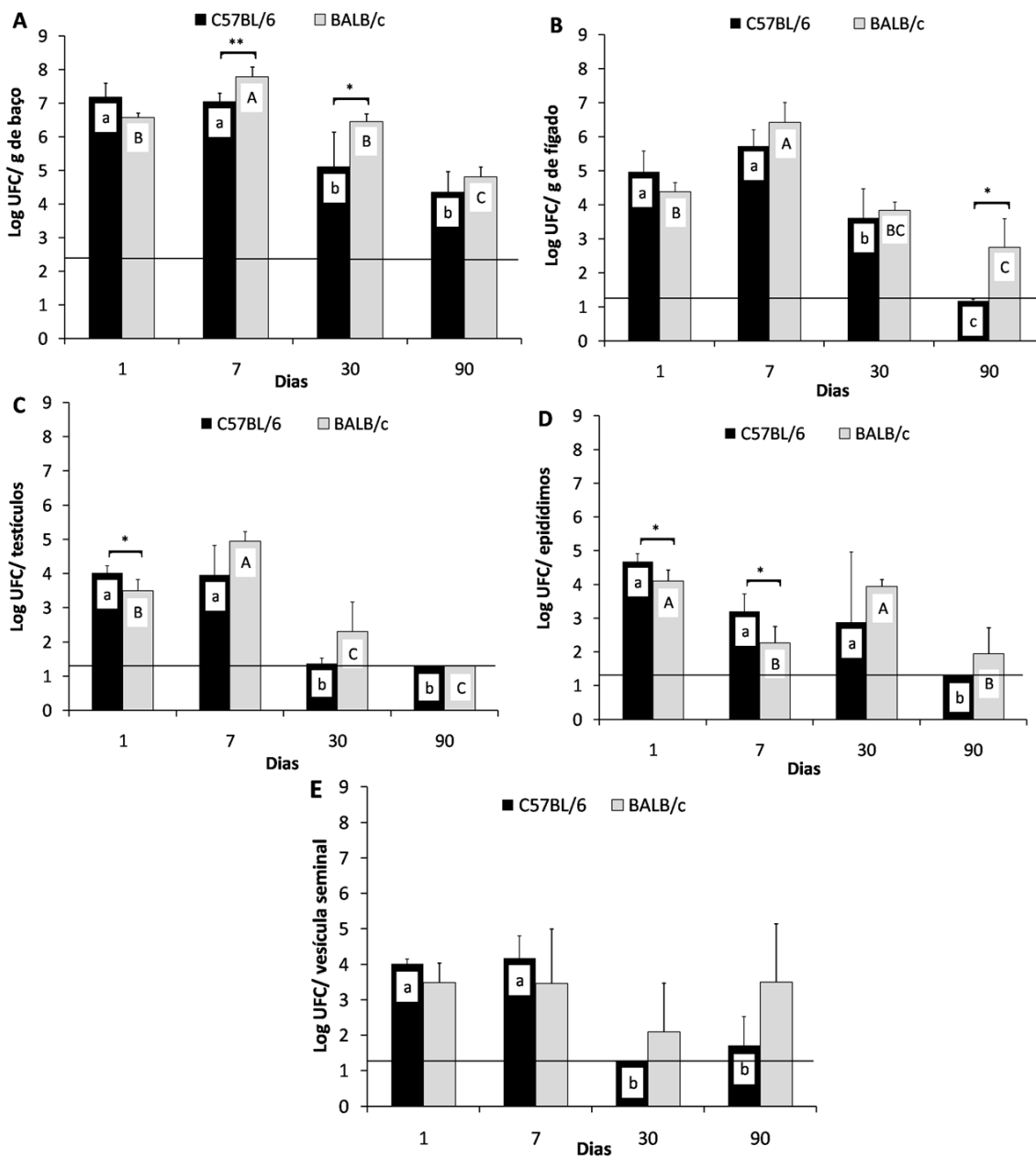


Figura 2: Cinética de infecção de *Brucella ovis* em camundongos machos BALB/c e C57BL/6. Cada animal foi inoculado com 1×10^6 UFC de amostra virulenta de *B. ovis*, via intraperitoneal. Foram avaliados colonização bacteriana aos 1, 7, 30 e 90 dpi no baço (A), fígado (B), testículos (C), epidídimos (D) e vesícula seminal (E). Os dados representam média e desvio padrão de grupos de camundongos (n=4) de um único experimento. A diferença significativa entre as duas linhagens de camundongo está indicada por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Diferença significativa entre os tempos dentro de uma mesma linhagem está indicada por letras distintas (letras minúsculas = C57BL/6; letras maiúsculas = BALB/c). Linha horizontal indica o limite de detecção de UFC em cada órgão.

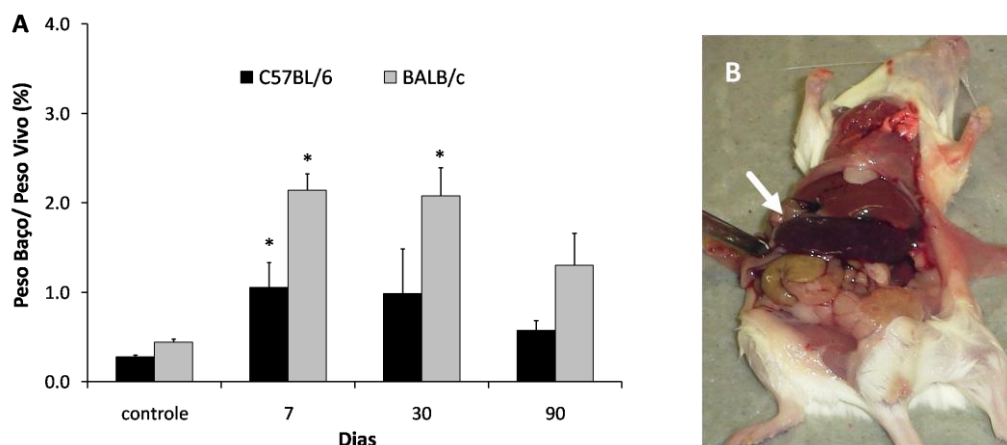


Figura 3: Esplenomegalia em camundongos machos durante a infecção por *Brucella ovis*. (A) Peso do baço em relação ao peso vivo (%) de camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 7, 30 e 90 dias após inoculação de 1×10^6 UFC/animal de *B. ovis*. O grupo controle foi inoculado com PBS estéril. A diferença significativa entre grupo infectado e controle está indicada por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (B) Macroscopia de camundongo BALB/c aos 90dpi com evidente esplenomegalia (seta).

Tabela 3. Escore médio de lesões inflamatórias no baço e fígado de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante a infecção por *Brucella ovis*.

Baço	Dias pós infecção				Fígado	Dias pós infecção			
	1	7	30	90		1	7	30	90
BALB/c	0 ^b	1,25 ^a	1,13 ^{ab}	0,63 ^{ab}	BALB/c	0 ^b	1,63 ^{a*}	1,13 ^{ab}	0,88 ^{ab}
C57BL/6	0 ^b	0,38 ^{ab}	1,05 ^a	0,13 ^{ab}	C57BL/6	0,25 ^b	1,88 ^a	1,50 ^{ab}	0,50 ^{ab}

Letra distintas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$). * $p < 0,01$.

Adicionalmente, camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram discreta imunomarcação intralésional de *B. ovis* presentes no citoplasma de macrófagos, principalmente em microgranulomas hepáticos aos 7 dpi (Figura 4E). A imunodeteção do patógeno, portanto, confirma que as alterações inflamatórias descritas no baço e fígado são resultantes da infecção sistêmica por *B. ovis* no camundongo.

No trato genital masculino, as lesões inflamatórias foram predominantemente caracterizadas por discreto infiltrado neutrofílico e linfo-histiocitário próximo ao testículo, epidídimo e, menos frequentemente na vesícula seminal e no tecido adiposo adjacente (Figura 4C,D). Somente um animal

BALB/c aos 30 dpi apresentou moderado infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e neutrofílico no interstício da vesícula seminal. A inflamação peritesticular e periepididimária foram descritas bilateralmente em todos os animais infectados. Além disso, a discreta imunomarcação de *B. ovis* associada à periorquite e periepididimite permitiu relacionar as alterações inflamatórias no trato genital com a presença local do patógeno (Figura 4F). Contudo, a baixa colonização bacteriana do sistema reprodutivo de camundongos durante a infecção sistêmica por *B. ovis* e as alterações histológicas restritas ao tecido adjacente evidenciam a ausência de tropismo do organismo pelo trato genital masculino.

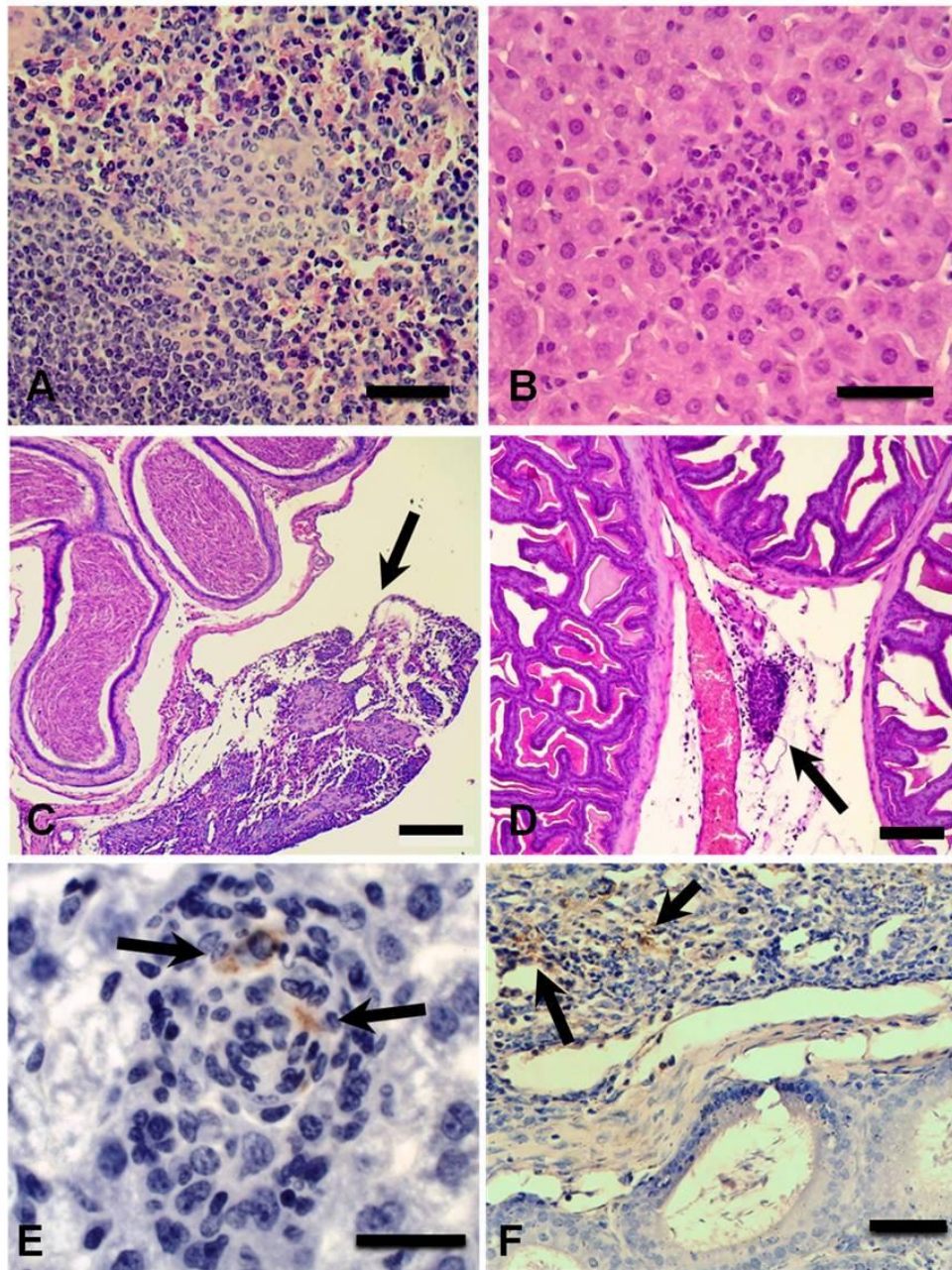


Figura 4: Histologia e imunoistoquímica de camundongos machos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Brucella ovis*. (A) Baço de BALB/c aos 30 dpi e (B) fígado de C57BL/6 aos 7 dpi com microgranuloma multifocal, composto predominantemente por macrófagos. Barra: 100 μ m. (C) Epidídimo e (D) vesícula seminal de BALB/c aos 7 dpi, com discreto infiltrado neutrofilico e histiocitário no tecido adjacente. Barra 400 μ m. (E) Imunomarcção de *B. ovis* intralésional em microgranuloma hepático de C57BL/6 aos 7 dpi; Barra 70 μ m (F) Imunomarcção discreta adjacente ao epidídimo associado ao infiltrado inflamatório em BALB/c aos 30 dpi. Barra: 100 μ m.

Mutagênese e identificação de fatores de virulência em *Brucella ovis*

Os mutantes gerados a partir de *B. ovis* foram confirmados através de análise pela PCR (Figura 5). A deleção do gene *virB2* de *B. ovis* na cepa mutante TMS1 ($\Delta virB2$) foi avaliada por PCR, com base na alteração do tamanho do produto de amplificação, conforme detalhado na Figura 5. Um fragmento de 734 pb do operon *virB* foi amplificado da amostra virulenta de *B. ovis* (ATCC 25840). O mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* apresentou produto de PCR maior (1521 pb) do que a amostra virulenta de referência, devido à inserção do cassete de resistência à canamicina na região alvo de amplificação após a deleção do *virB2* (Figura 5A, 5C). A deleção dos ORFs BOVA0500 e BOVA0501

no mutante ΔABC transportador (TMS3) e do gene BOVA0512 no mutante Δ hemaglutinina (TMS2) também foram confirmadas (Figura 5B-C). O alvo de amplificação foi a região especificamente deletada em cada mutante, sendo o mutante ΔABC transportador negativo somente para BOVA0500/501 (135 pb) e o mutante Δ hemaglutinina negativo para BOVA0512 (225 pb). Outros genes de *B. ovis* avaliados foram conservados nas amostras mutantes, inclusive o gene *bcp31* (223 pb) que é altamente conservado no gênero *Brucella*. Como controle positivo para todas as reações de PCR, foi utilizada a amostra referência ATCC 25840 de *B. ovis* (Figura 5B).

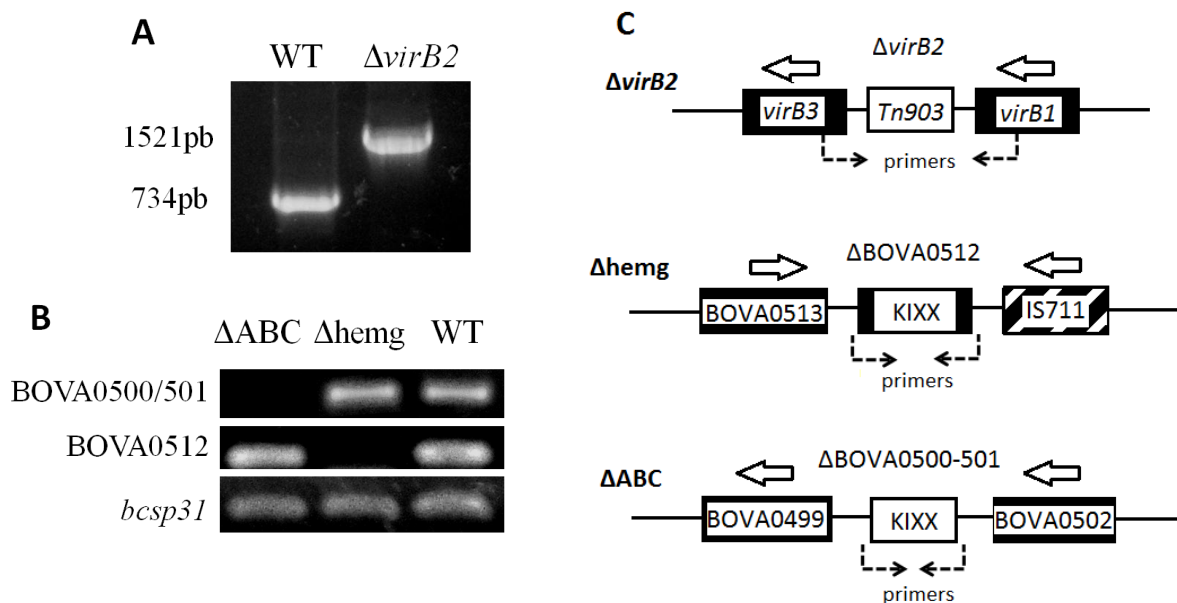


Figura 5: Confirmação de mutagênese de *Brucella ovis* pela PCR. (A) Amplificação de fragmento de 734 pb do operon *virB* presente na amostra virulenta de referência de *B. ovis* (ATCC 25840). No mutante $\Delta virB2$, a inserção do cassete de canamicina resultou na amplificação de um produto maior (1521 pb). (B) Confirmação da deleção dos ORFs BOVA0500/501 (135 pb) no mutante ΔABC transportador (ΔABC) e de BOVA0512 (225 pb) no mutante Δ hemaglutinina ($\Delta hemg$) de *B. ovis*. O gene *bcp31* (223 pb) foi amplificado como controle interno do gênero *Brucella*. Todos os genes analisados são conservados na amostra de referência de *B. ovis* ATCC 25840. (C) Ilustração da deleção e da região amplificada por PCR nos mutantes gerados para a confirmação da mutagênese.

Em seguida, foi avaliada a cinética de infecção dos mutantes no modelo de infecção *in vivo* em camundongos. Grupos de 4 ou 8 camundongos machos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com aproximadamente 1×10^6 UFC por animal de amostra virulenta de *B. ovis* ou uma das amostras mutantes geradas. Os valores de UFC recuperados do baço e fígado foram comparados entre os grupos infectados por amostra WT e por mutantes isogênicos nos tempos 1, 7, 30 e 90 dpi, como demonstrado na Figura 6.

Camundongos infectados com mutantes $\Delta virB2$ ou ΔABC transportador de *B. ovis* apresentaram colonização bacteriana no baço e no fígado significativamente menor ($p < 0,001$) do que os grupos infectados com a amostra de referência de *B. ovis* em todos os tempos avaliados (Figura 6A,B). No baço, os mutantes $\Delta virB2$ e ΔABC transportador foram recuperados aos 30 dpi somente em um animal. Os valores de UFC de ambos os mutantes recuperados do fígado foram muito reduzidos a partir de 7 dpi (Figura 6B). Os dados bacteriológicos evidenciam que $\Delta virB2$ e ΔABC transportador de *B. ovis* são atenuados no baço e fígado de camundongos a partir de 1 dpi, o que demonstra a menor patogenicidade destas amostras mutantes durante a infecção *in vivo* em camundongos.

Por outro lado, camundongos infectados com a cepa mutante Δ hemaglutinina apresentaram elevados valores de UFC no baço e fígado com 1 e 7 dpi, seguida de diminuição significativa da colonização bacteriana a partir de 30 dpi. Em todos os tempos avaliados, não houve diferença significativa entre a colonização bacteriana pela cepa mutante Δ hemaglutinina e amostra de referência de *B. ovis*, tanto no baço quanto no fígado (Figura 6A,B). Adicionalmente, valores de UFC da cepa mutante Δ hemaglutinina recuperados no baço foram maiores durante todo o curso da infecção

quando comparados aos do fígado, como descrito anteriormente para a amostra de referência em camundongos BALB/c. A cinética de infecção e a colonização pela cepa mutante Δ hemaglutinina em camundongos machos foi, portanto, muito semelhante à descrita para a amostra virulenta de *B. ovis*, o que demonstra o mesmo nível de patogenicidade de ambas as amostras. Assim, este dado sugere que o gene putativo que codifica a hemaglutinina não está envolvido na patogenicidade de *B. ovis* durante a infecção *in vivo*.

O baço e o fígado de camundongos infectados com amostras mutantes também foram avaliados histologicamente e através de imunoistoquímica. As alterações inflamatórias e o escore médio de lesões observadas durante a infecção estão demonstrados na Figura 7 e Tabela 4, respectivamente. Camundongos infectados com a cepa mutante Δ hemaglutinina apresentaram microgranulomas multifocais discretos no baço a partir de 7 dpi. No fígado, foram observados microgranulomas multifocais moderados, compostos por macrófagos e raros neutrófilos no centro da lesão, sendo esta alteração mais evidente aos 7 e 30 dpi (Figura 7A). Os escores médio de lesões observadas no baço e no fígado de camundongos infectados com a cepa mutante Δ hemaglutinina foram similares aos escores da lesões resultantes da infecção com a amostra de referência de *B. ovis*, sendo que as lesões mais acentuadas foram observadas aos 7 e 30 dpi em ambos os grupos. Adicionalmente, foi observada imunomarcagem de *B. ovis* no citoplasma de macrófagos associados a microgranulomas hepáticos em camundongos infectados com a cepa mutante Δ hemaglutinina, principalmente aos 7 dpi (Figura 7B).

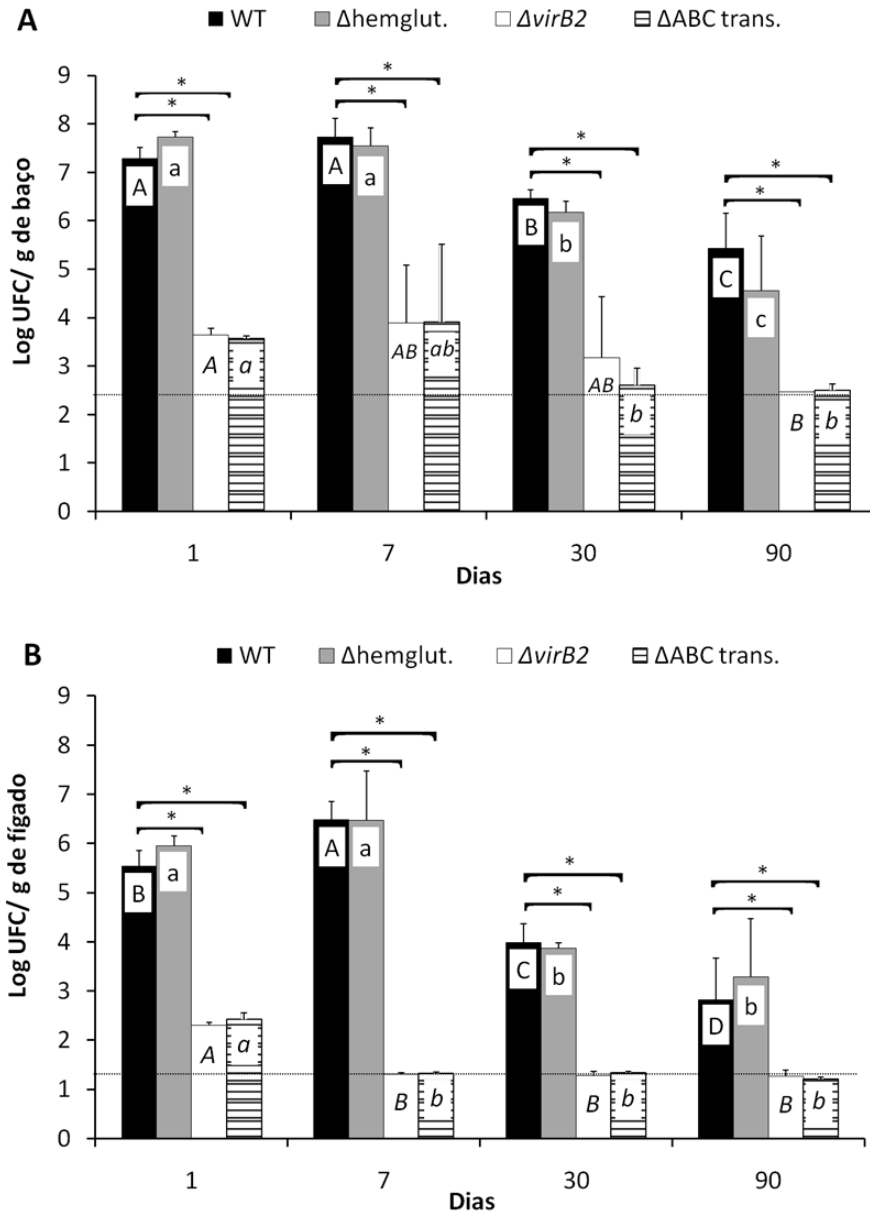


Figura 6: Infecção de camundongos machos BALB/c por cepas mutantes de *Brucella ovis*. Colonização bacteriana de amostra virulenta de referência (ATCC 25840) e amostras mutantes de *B. ovis* no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c aos 1, 7, 30 e 90 dpi. Grupos de camundongos (n=4) foram inoculados com 1×10^6 UFC/animal de Δ hemaglutinina, Δ virB2, Δ ABC transportador ou da amostra de referência de *B. ovis*. A diferença significativa entre a amostra parental e as amostras mutantes está indicada por asterisco (* $p < 0,001$). Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos avaliados dentro de uma mesma amostra mutante está indicada por letras distintas (letra maiúscula-WT; letra minúscula- Δ hemaglutinina; letra maiúscula itálica- Δ virB2; letra minúscula itálica- Δ ABC transportador). A linha horizontal indica o limite de detecção de UFC em cada órgão.

As alterações histológicas e a severidade das lesões descritas durante a infecção pela cepa mutante Δ hemaglutinina no modelo murino foram muito similares às descritas anteriormente durante a infecção com a amostra de referência de *B. ovis* (Tabela 4), o que confirma que a patogenicidade deste mutante isogênico foi mantida.

Contudo, nenhuma alteração histopatológica significativa foi observada no baço e no fígado de camundongos infectados com as cepas mutantes Δ virB2 ou Δ ABC transportador de *B.*

ovis (Tabela 4 e Figura 7C,D). Além disso, não foi observada imunomarcagem em nenhum dos órgãos avaliados de ambos os mutantes. O resultado histopatológico e da imunistoquímica de baço e fígado estão em concordância com os baixos valores de colonização bacteriana descritos anteriormente para os mutantes Δ virB2 ou Δ ABC transportador. Estes resultados confirmam a menor patogenicidade de ambos os mutantes em comparação à amostra virulenta de *B. ovis* no modelo murino de infecção.

Tabela 4. Escore médio de lesões inflamatórias no baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com cepas mutantes de *Brucella ovis*.

Baço	Dias pós infecção				Fígado	Dias pós infecção			
	1	7	30	90		1	7	30	90
WT	0 ^b	0.9 ^b	0.71 ^a	0.17 ^b	WT	0.16 ^b	2.17 ^a	1.44 ^a	0.75 ^a
hemg	0 ^b	0.87 ^b	0.33 ^{ab}	0 ^b	hemg	0 ^b	2.13 ^a	1.33 ^a	0.50 ^{ab}
ABC	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	ABC	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
virB2	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	virB2	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b

Letra distintas na mesma coluna diferem entre si (p<0.05).

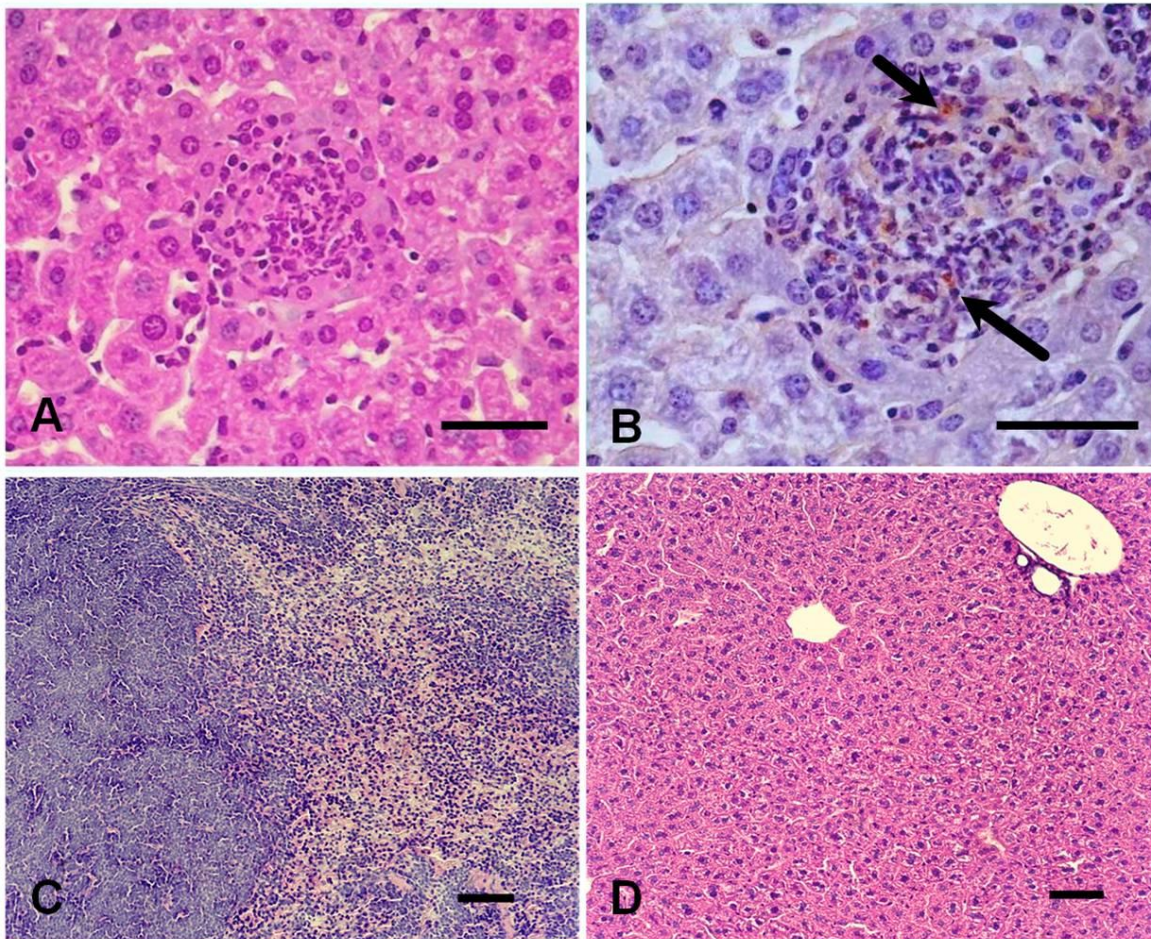


Figura 7: Histologia e imunoistoquímica de órgãos de camundongos machos BALB/c infectados com cepas mutantes de *Brucella ovis*. (A) Microgranulomas multifocais moderados no fígado de camundongo BALB/c infectado com a cepa mutante Δ hemaglutinina aos 7 dpi. (B) Discreta imunodeteção de bactéria intralésional em macrófagos associados ao microgranuloma hepático (setas). Barra: 100 μ m. (C-D) Ausência de lesões histopatológicas em camundongos BALB/c infectados com 1×10^6 UFC/animal das cepas mutantes Δ virB2 ou Δ ABC transportador. (C) Baço de BALB/c aos 7 dpi infectado com a cepa mutante Δ virB2; (D) Fígado de BALB/c aos 30 dpi infectado com a cepa mutante Δ ABC transportador. Barra: 200 μ m.

Para avaliar a cinética de infecção inicial intraperitoneal das amostras mutantes atenuadas de *B. ovis* no modelo murino, grupos de camundongos machos BALB/c (n=4) foram inoculados com 1×10^6 UFC/animal dos mutantes $\Delta virB2$, ΔABC transportador ou com a amostra de referência de *B. ovis*. A sobrevivência bacteriana extracelular e intracelular em macrófagos peritoneal às 6, 12 e 24 horas pós infecção (hpi) foram comparadas entre as amostras (Figura 8). Além disso, foi observada a capacidade de distribuição sistêmica dos mutantes atenuados, ao avaliar a colonização bacteriana esplênica até 24 hpi.

No início da infecção (6 hpi), os valores de UFC extracelular recuperados da cavidade peritoneal foram muito semelhantes entre as amostras mutantes e parental de *B. ovis*. Porém, a partir de 12 hpi, houve diminuição significativa dos valores de UFC dos mutantes $\Delta virB2$ e ΔABC transportador, quando comparados à amostra virulenta de *B. ovis*, que foi capaz de sobreviver no meio extracelular até 24 hpi (Figura 8A). Ao avaliar a infecção *in vivo* de macrófagos peritoneais de camundongos, foi observado que a sobrevivência intracelular das amostras mutantes às 6 hpi não foi significativamente diferente da amostra parental (Figura 8B). Contudo, com 12 hpi, os valores de UFC de $\Delta virB2$ e ΔABC transportador em

macrófagos peritoneais foram significativamente menores quando comparados a cepa parental, o que demonstra que ambos os mutantes sobrevivem menos intracelularmente ($p < 0,01$) do que a amostra de referência de *B. ovis*. Adicionalmente, a amostra virulenta de *B. ovis* foi capaz de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos peritoneais, o que resultou no aumento de 1 log dos valores de UFC entre 12 e 24 hpi. No baço, a colonização pelos mutantes $\Delta virB2$ e ΔABC transportador foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que a colonização pela amostra de referência de *B. ovis* desde o início até o final do experimento (entre 6 e 24 hpi). Além disso, a amostra de referência de *B. ovis* foi capaz de sobreviver e replicar no baço, o que levou ao aumento dos valores de UFC com o curso da infecção. No entanto, ambos os mutantes não sobreviveram no baço, com baixa contagem bacteriana às 24 hpi (Figura 8C). Assim, os dados apresentados estão em concordância com os resultados bacteriológicos obtidos anteriormente durante a infecção *in vivo* do modelo murino. Portanto, as amostras mutantes $\Delta virB2$ e ΔABC transportador apresentam menor patogenicidade em camundongos machos do que *B. ovis*, devido à incapacidade de sobreviver intracelularmente em macrófagos peritoneais e no meio extracelular, não conseguindo estabelecer infecção crônica *in vivo*.

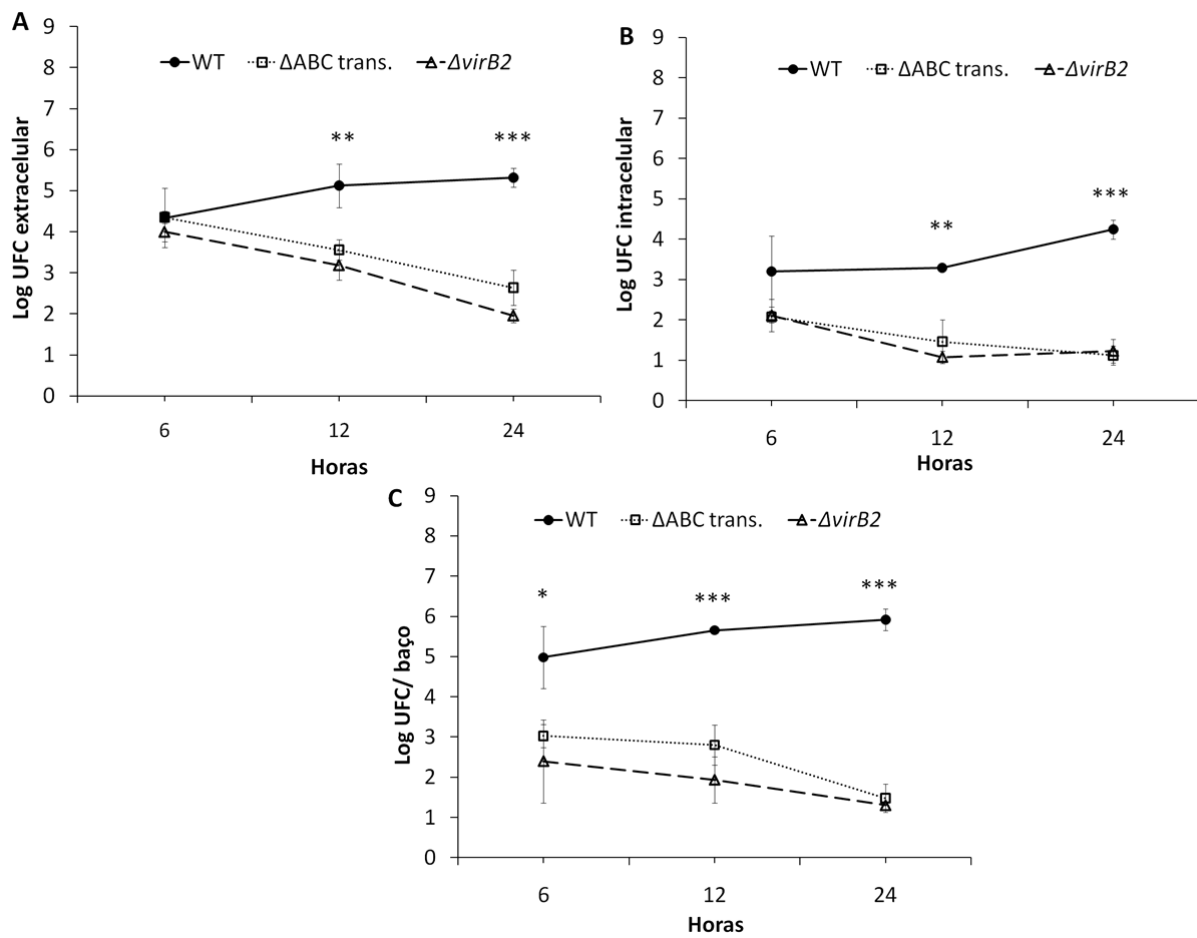


Figura 8: Infecção *in vivo* de macrófago peritoneal com a amostra de referência (ATCC 25840) e cepas mutantes de *B. ovis* em camundongos machos BALB/c. Avaliação da sobrevivência total extracelular (A) e intracelular (B) de WT(●), ΔABC transportador (□) e ΔvirB2 (Δ) às 6, 12 e 24 horas após inoculação intraperitoneal de 1×10^6 UFC/animal. (C) Colonização total de baço pela amostra de referência, ΔABC transportador e ΔvirB2 às 6, 12 e 24 hpi. Os dados representam média e desvio padrão de grupos de camundongos (n=4) de um único experimento. Diferença significativa entre a amostra de referência e as cepas mutantes está indicada por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Para confirmar a atenuação do mutante ΔABC transportador de *B. ovis*, foram utilizados camundongos machos IRF-1^{-/-}, que apresentam resposta imunológica via IFN- γ alterada, além de deficiente indução de IL-12 e ativação de células CD8⁺ e “natural killers” (Ko et al., 2002a). Camundongos IRF-1^{-/-} foram inoculados com 2,3x10⁶ UFC/animal da cepa mutante ΔABC transportador (n=5) ou da amostra de referência de *B. ovis* (n=5) e avaliados quanto ao índice de letalidade de cada grupo (Figura 9). Camundongos infectados com a amostra parental de referência de *B. ovis* morreram a partir de 11

dpi, sendo que 60% dos animais morreram aos 13 dpi. Os dados demonstram que camundongos machos IRF-1^{-/-} não são capazes de controlar a infecção por amostra virulenta de *B. ovis*, o que resultou em 100% de letalidade até 14 dpi. Entretanto, todos os animais infectados com ΔABC transportador de *B. ovis* sobreviveram até 21 dpi, o que foi significativamente diferente (p=0.0079) do grupo infectado com a amostra virulenta de *B. ovis*. Portanto, a amostra mutante ΔABC transportador é atenuada em camundongos IRF-1^{-/-}, uma vez que a infecção não é letal para os animais imunocomprometidos.

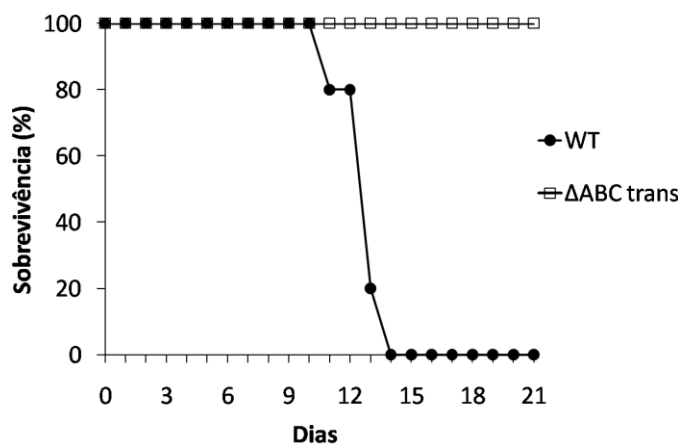


Figura 9: Sobrevivência de camundongos machos IRF-1^{-/-} infectados com amostra mutante ΔABC transportador ou WT de *Brucella ovis*. Grupos de camundongos (n=5) foram inoculados com 2,3x10⁶ UFC/animal de mutante ΔABC transportador ou amostra de referência de *B. ovis* (ATCC 25840) e monitorados diariamente até 21 dpi. Camundongos IRF-1^{-/-} infectados com ΔABC transportador sobreviveram mais do que camundongos infectados com WT de *B. ovis* (p=0,0079).

DISCUSSÃO

O papel de proteínas transportadoras do sistema ABC em espécies clássicas de *Brucella* spp. tem sido avaliado em camundongos (Ko e Splitter, 2000; Rosinha et al., 2002; Danese et al., 2004). Com o completo sequenciamento genômico de *B. ovis*, foi identificada uma ilha no cromossomo II que possivelmente codifica fatores patogênicos específicos de *B. ovis*,

inclusive um transportador do sistema ABC (Tsolis et al., 2009). Na *B. ovis*, a deleção de dois ORFs (BOVA0500 e BOVA0501, Genbank) que codificam o ABC transportador resultou na atenuação da amostra mutante no baço e fígado de camundongos machos a partir de 1 dia após a infecção, o que sugere um papel importante para o sistema ABC na patogênese de *B. ovis* e no estabelecimento da infecção em modelo murino. O sistema ABC é responsável pelo

transporte transmembrana ativo de aminoácidos, íons, peptídeos, entre outros (Tam e Saier, 1993), sendo que a maioria dos transportadores ABC codificados pela *Brucella* spp. estão envolvidos na importação destes substratos para o interior da bactéria (Jenner et al., 2009). Já foi demonstrado que a proteína ABC transportadora de polissacarídeo é essencial para a patogênese de *B. abortus* em modelo murino, sendo a amostra mutante atenuada no baço (Rosinha et al., 2002). Entretanto, há estudos que descrevem proteínas transportadoras do sistema ABC que não são essenciais para a sobrevivência intracelular e a infecção persistente de *B. abortus* em camundongos (Ko e Splitter, 2000; Danese et al., 2004).

Além disso, o mutante Δ ABC transportador de *B. ovis*, com 24 hpi, não foi capaz de sobreviver intracelularmente em macrófagos peritoneal e no meio extracelular, o que resultou em baixa colonização do mutante no baço desde o início da infecção. É importante ressaltar que *B. ovis* é a espécie clássica de *Brucella* spp. que codifica o menor número de proteínas ABC transportadoras, uma vez que apresenta elevado número de pseudogenes no sistema ABC (Jenner et al., 2009; Tsolis et al., 2009). Isto resulta na incapacidade de *B. ovis* de importar alguns substratos utilizando o sistema ABC, como poliaminas, tiaminas, eritritol, xilose, entre outros, o que pode determinar a menor patogenicidade desta espécie durante a infecção animal (Jenner et al., 2009). Além disso, a recente classificação dos sistemas ABC da *Brucella* spp. e o sequenciamento de *B. ovis* permitiu identificar o ABC transportador avaliado neste estudo como uma proteína supostamente envolvida na importação de dipeptídeos na *B. ovis* (Jenner et al., 2009; Tsolis et al., 2009). Interessantemente, foi observado pseudogenes e a deleção de genes na *B. ovis* em regiões que potencialmente codificam

outros sistemas ABC para o transporte de peptídeos nas demais espécies clássicas de *Brucella* spp. Isto justifica o papel patogênico específico do ABC transportador na *B. ovis*, uma vez que nesta espécie, provavelmente, não há vias alternativas para a importação de peptídeos, o que resulta na perda completa da virulência de *B. ovis* com a deleção de uma única proteína transportadora.

Há evidências de que a ilha patogênica que codifica este ABC transportador na *B. ovis* está ausente nas demais espécies clássicas de *Brucella*, porém, é conservada em amostras marinhas de *Brucella* sp. isoladas de golfinhos (Tsolis et al., 2009). Considerando estas informações, foi avaliado a presença das sequências deletadas no mutante Δ ABC transportador de *B. ovis* (BOVA0500 e BOVA0501, Genbank) em todas as espécies de *Brucella* já sequenciadas e que estão disponíveis no banco de dados *Broad Institute* (<http://www.broadinstitute.org/>). Foi demonstrado que ambas as sequências são conservadas (com ~99% de identidade) em três espécies marinhas de *Brucella*, denominadas *B. pinnipedialis* M292, *B. pinnipedialis* B2/94 e *Brucella* sp. F5/99. A *Brucella* sp. F5/99 é uma amostra marinha originalmente isolada de feto abortado de golfinhos, enquanto *B. pinnipedialis* M292 e B2/94 são amostras isoladas de focas. Interessantemente, há outras amostras isoladas de golfinhos e focas que foram classificados como *B. pinnipedialis* e *B. ceti*, respectivamente, que não apresentam estes genes que potencialmente codificam uma proteína ABC transportadora patogênica. Estes dados evidenciam que a classificação de isolados marinhos de *Brucella* ainda é provisória, sendo necessário considerar, além dos hospedeiros naturais, as diferenças genômicas existentes entre as espécies marinhas de *Brucella* sp. que potencialmente estão relacionadas ao nível de patogenicidade das amostras. Adicionalmente, é de grande

importância avaliar o papel específico deste ABC transportador nas amostras marinhas de *Brucella* sp., uma vez que esta proteína, essencial para a virulência de *B. ovis*, provavelmente, está envolvida na patogênese de outras espécies de *Brucella* que têm elevado potencial zoonótico.

No gênero *Brucella*, já foram identificados diversos fatores de virulências que são essenciais para a sobrevivência, replicação e, conseqüentemente, para o estabelecimento da infecção no modelo animal (Gorvel e Moreno, 2002). Dois destes fatores amplamente estudados e comparados entre as espécies patogênicas de *Brucella* spp. são: a cadeia O do LPS (Godfroid et al., 2000; Jimenez de Bagüés et al., 2004; Lapaque et al., 2005) e o sistema de secreção tipo IV (SST4) (O'Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Boschirolí et al., 2002). Sabe-se que a *B. ovis* é uma espécie estavelmente rugosa, uma vez que não possui a cadeia O do LPS (Godfroid et al., 2000), o que lhe confere menor patogenicidade durante a infecção animal, quando comparada às espécies lisas de *Brucella* spp., como *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* (Lapaque et al., 2005). No entanto, ainda não foi claramente descrito o papel de SST4 para o estabelecimento da infecção crônica de *B. ovis* no animal. Assim, foi desenvolvido neste estudo um mutante de *B. ovis* com SST4 afuncional, a partir de deleção polar do gene *virB2*, para avaliar a importância de SST4 durante a infecção em modelo murino macho.

A mutação polar do gene *virB2* de *B. ovis* resultou em uma amostra mutante com SST4 afuncional e que foi atenuada no baço e fígado de camundongos machos BALB/c em todos os tempos avaliados. Os resultados bacteriológicos e histopatológicos evidenciam que o SST4 é um fator de virulência importante para *B. ovis*, ao determinar a persistência da infecção em modelo murino. Adicionalmente, a atenuação

de $\Delta virB2$ de *B. ovis* foi observada desde o início da infecção (1 dpi). O SST4, codificado pelo operon *virB*, é um dos principais fatores de virulência que determina a sobrevivência e replicação intracelular de *Brucella* spp. em macrófagos e a infecção persistente em camundongos (O'Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000; den Hartigh et al., 2004). Através de recentes análises genômicas, foi demonstrado que os genes que constituem o operon *virB* (*virB1* a *virB12*) também estão conservados na *B. ovis* e que esta espécie, possivelmente, codifica um SST4 funcional, como descrito nas demais espécies de *Brucella* spp. (Tsolis et al., 2009). Este sistema de secreção é capaz inibir a maturação do fagossomo e a fusão com o lisossomo, permitindo que o organismo alcance o seu sítio de replicação no interior de células fagocíticas (Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Gorvel e Moreno, 2002; Celli et al., 2003). Em concordância com os resultados obtidos em *B. ovis*, estudos prévios demonstram que a mutação polar de *virB* em espécies clássicas de *Brucella* spp., como *B. abortus* e *B. melitensis*, resulta em amostras que são atenuadas em camundongos, uma vez que perdem a capacidade de se replicar intracelularmente (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; den Hartigh et al., 2004; Paixão et al., 2009). Contudo, há indícios que o SST4 de *Brucella* spp. não é essencial para a colonização inicial esplênica em camundongos, mas sim, para estabelecer uma infecção persistente no animal. (Rolán e Tsolis, 2007). Assim, ao contrário de *B. ovis*, a atenuação de cepa mutante *virB* de *B. abortus* no baço de camundongos é observada a partir de 4 dpi (Rolán e Tsolis, 2007). Portanto, o mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* demonstra um fenótipo diferente de outros mutantes *virB* de *Brucella* spp., uma vez que é atenuado no baço e fígado de camundongos desde 1 dpi.

Na tentativa de compreender a cinética inicial da infecção por $\Delta virB2$ de *B. ovis* em camundongos, foi avaliado a sobrevivência do mutante em macrófagos peritoneal, no meio extracelular da cavidade peritoneal e no baço até 1 dpi. O mutante $\Delta virB2$ não é capaz de sobreviver e replicar intracelularmente em macrófagos peritoneais e, conseqüentemente, não consegue estabelecer uma infecção persistente no modelo murino, o que justifica a baixa colonização esplênica desde 6 hpi por via intraperitoneal. Além disso, a menor sobrevivência de $\Delta virB2$ na cavidade peritoneal após 12 horas de infecção, quando comparada à amostra parental de *B. ovis*, demonstra a maior susceptibilidade deste mutante inclusive no meio extracelular. Sabe-se que a cadeia O de LPS tem importante papel na sobrevivência inicial extracelular de *Brucella* spp., uma vez que mutantes rugosos são mais susceptíveis à ação de complementos e peptídeos antimicrobianos (Lapaque et al., 2005). Contudo, o LPS rugoso da amostra mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* aparentemente não está relacionada a sua menor patogenicidade e sobrevivência no meio extracelular no animal, uma vez que a amostra virulenta de *B. ovis*, que é naturalmente rugosa, é capaz de sobreviver na cavidade peritoneal de camundongos. Portanto, deve-se considerar que o SST4 é essencial tanto para a sobrevivência intracelular como extracelular de *B. ovis* durante fase inicial da infecção *in vivo*, sendo necessário maiores estudos.

Outra proteína de membrana avaliada neste estudo e que possivelmente está envolvida na patogenidade da *Brucella* spp. é a hemaglutinina (Rocha-Garcia et al., 2002; Perry et al., 2010). Na *B. ovis*, a hemaglutinina específica desta espécie é codificada por um gene (BOVA0512, Genbank) de uma ilha específica presente no cromossomo II. Foi observado que a cepa mutante Δ hemaglutinina de *B. ovis* apresenta

níveis de colonização e alterações histopatológicas no baço e fígado semelhantes à amostra parental de referência. Estes dados sugerem que a hemaglutinina codificada pela ilha genômica específica de *B. ovis* não está envolvida na patogênese de *B. ovis*, uma vez que amostra mutante Δ hemaglutinina apresenta a mesma patogenicidade que a amostra virulenta de *B. ovis* durante a infecção em modelo murino. A hemaglutinina de *Brucella* spp. está relacionada à adesão e aglutinação da hemácia de animais (Rocha-Garcia et al., 2002). Recentemente, foi demonstrado em *B. melitensis* que esta proteína possivelmente está relacionada à ocorrência de aborto durante a infecção de caprinos (Perry et al., 2010). Em concordância com os resultados obtidos em *B. ovis*, Perry et al. (2010) demonstraram que a hemaglutinina de *B. melitensis* não é essencial para o estabelecimento da infecção em caprinos, uma vez que a amostra mutante também é capaz de se distribuir sistemicamente e colonizar o baço.

Considerando que *B. ovis* é uma das principais causas de infertilidade em ovinos e que a doença é caracterizada, principalmente, por epididimite e orquite em carneiros sexualmente maduros (Burguess, 1982; Blasco, 1990), o desenvolvimento de novos estudos em modelos animais machos é de grande importância. Além disso, sabe-se que o camundongo tem sido o modelo de infecção mais utilizado para estudar a patogênese de diversas espécies de *Brucella* spp. (Enright et al., 1990; Ficht, 2002; Baldwin e Parent, 2002; Izadjoo et al., 2008; Smither et al., 2009; Paixão et al., 2009). Contudo, há escassos trabalhos que caracterizam a infecção por *B. ovis* em camundongos, uma vez que a maioria dos estudos neste modelo animal está voltada para avaliar a resposta imunológica contra *B. ovis* (Jimenez de Bagüés et al., 1993 e 1994; Cassataro et al.,

2007). Assim, este estudo desenvolveu um modelo de infecção para *B. ovis* em camundongos machos das linhagens BALB/c e C57BL/6, caracterizando a cinética de infecção e as alterações histopatológicas até 90 dias após a inoculação por via intraperitoneal.

Foi utilizado, neste estudo, a dose de 10^6 UFC por animal por via intraperitoneal, o que levou ao estabelecimento da infecção e a distribuição sistêmica de *B. ovis* no modelo murino. A inoculação intraperitoneal é a principal via de infecção utilizada em camundongos, uma vez que favorece a disseminação sistêmica imediata do organismo (Stevens et al., 1994; Olsen et al., 2007). Adicionalmente, foi demonstrado que as doses 10^5 a 10^7 UFC de *B. ovis* por animal resultam em colonização similar de baço e fígado em camundongos machos BALB/c, não sendo necessária a utilização de elevadas doses para estabelecer a infecção neste modelo animal. Em concordância com este estudo, Jiménez de Bagüés et al. (1993) descreveram que doses acima de 10^7 UFC de *B. ovis* por animal por via intraperitoneal não são necessárias para o estabelecimento da infecção em camundongos machos CD1, uma vez que não resultam em aumento da colonização esplênica.

Camundongos machos infectados com *B. ovis* apresentaram elevada colonização bacteriana principalmente no baço e fígado. Nestes animais, também foi observada significativa esplenomegalia durante o curso da infecção, o que, possivelmente, está elevada contagem bacteriana no baço. Estudos prévios demonstram que a esplenomegalia é uma alteração macroscópica frequentemente observada durante a infecção sistêmica de modelo murino por amostras virulentas de *Brucella* spp., sendo mais evidente quando a inoculação é por via intraperitoneal (Enright et al., 1990; Tobias et al., 1993). Na avaliação histopatológica do baço e do fígado, tanto

camundongos BALB/c quanto C57BL/6 infectados com *B. ovis* apresentaram microgranulomas multifocais, constituídos predominantemente por infiltrado histiocitário e macrófagos epitelióides. Esta alteração inflamatória é frequentemente observada durante a infecção sistêmica de camundongos por outras espécies patogênicas de *Brucella* spp. (Enright et al., 1990; Tobias et al., 1993; Ko et al., 2002a; Paixão et al., 2009). Interessantemente, as lesões histológicas em camundongos infectados por *B. ovis* foram observadas principalmente aos 7 e 30 dpi, ou seja, durante a fase crônica da infecção animal associada à elevada colonização bacteriana dos órgãos. Os achados histopatológicos associados à acentuada colonização de baço e fígado caracterizam, portanto, um bom modelo murino de infecção para *B. ovis*.

Durante a infecção de camundongos por *B. ovis*, não houve diferença significativa quanto à colonização hepática e às alterações inflamatórias observadas entre as duas linhagens. Embora a esplenomegalia seja menos acentuada e a colonização esplênica significativamente menor aos 7 dpi ($p < 0,01$) e 30 dpi ($p < 0,05$) na linhagem C57BL/6, estes animais mantêm elevados valores de UFC até 90 dpi, quando também não apresentam resolução da infecção. Além disso, a colonização bacteriana de testículos e epidídimos em C57BL/6 é maior do que em BALB/c ($p < 0,05$) no início da infecção, o que não evidencia a resistência desta linhagem à infecção por *B. ovis*. Estudos prévios demonstram que a linhagem BALB/c é mais susceptível à infecção por *Brucella* spp. do que a linhagem C57BL/6, uma vez que esta apresenta contagem bacteriana de, aproximadamente, 1 log maior do que C57BL/6 durante o curso da infecção (Montaraz e Winter, 1986; Murphy et al., 2001; Baldwin e Parent, 2002). No entanto, este estudo demonstrou que camundongos

machos BALB/c e C57BL/6 apresentam cinética de infecção similar para *B. ovis* e que, possivelmente, os mecanismos específicos da resposta imunológica de C57BL/6 responsáveis por sua maior resistência contra as espécies patogênicas de *Brucella* (Murphy et al., 2001; Baldwin e Parent, 2002) não são capazes de controlar a infecção por *B. ovis*.

A infecção por *B. ovis* em camundongos machos, inicialmente, resulta em colonização de testículos, epidídimos e vesícula seminal, porém, há diminuição significativa dos valores de UFC a partir de 30 dpi. Além disso, a colonização oscilante de epidídimo e vesícula seminal de BALB/c entre os tempos avaliados não demonstra claramente a predileção de *B. ovis* pelo trato genital em camundongos machos. Já foi descrita a colonização do sistema reprodutivo de camundongos machos durante a infecção sistêmica por *Brucella* spp. (Rajashakara et al., 2005; Izadjoo et al., 2008). Também foi demonstrado, apesar de forma intermitente, a colonização de testículo de camundongos BALB/c sexualmente maduros infectados por *B. melitensis* (Idzajoo et al., 2008), que sabidamente causa orquite e infertilidade em animais e, menos frequentemente, no homem (Thoen et al., 1993). Em ovinos, a *B. ovis* apresenta forte tropismo pelo trato genital de carneiros sexualmente maduros (Ficapal et al., 1998). Após o estabelecimento da infecção no animal, com produção de bacteremia e distribuição sistêmica do patógeno, há colonização dos órgãos sexuais a partir de 30 dias após a infecção (Biberstein et al., 1964).

As principais alterações inflamatórias observadas no trato genital de camundongos machos foram periorquite e periepididimite linfo-histiocitária e neutrofílica, o que indica que a inflamação foi restrita ao tecido adjacente ao trato genital. Além disso, imunomarcção peritesticular e

periepididimária discreta de *B. ovis* associada à lesões bilaterais em todos os grupos avaliados confirmam que a infecção dos órgãos reprodutivos em camundongos não é resultante do tropismo de *B. ovis* pelo trato genital masculino. As alterações histológicas no trato genital são provavelmente justificadas pela inoculação do organismo por via intraperitoneal, o que resultou na inflamação local em todos os animais infectados. Em carneiros infectados por *B. ovis*, diferentemente de camundongos, as principais lesões descritas são epididimite, com acometimento unilateral da cauda do epidídimo, orquite e vesiculite, sendo as lesões caracterizadas por um infiltrado intersticial composto por macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Searson, 1987; Blasco, 1990; Santos et al., 2005). Portanto, os camundongos machos não servem como modelo da doença descrita em carneiros, porém, estes animais mostraram ser um bom modelo de infecção para *B. ovis*, o que permitiu o estudo comparativo da cinética de infecção de *B. ovis* e de mutantes isogênicos.

Adicionalmente, camundongos “knockouts” para IRF ($IRF-1^{-/-}$) foram utilizados para avaliar a virulência de *B. ovis* durante a infecção em modelo murino. Interessantemente, a amostra de referência de *B. ovis* é letal para camundongos $IRF-1^{-/-}$ machos até 14 dpi. Camundongos $IRF-1^{-/-}$ apresentam resposta imunológica alterada via sinalização de $IFN-\gamma$, o que impede o controle eficiente da infecção por *Brucella* spp. Sabe-se que a inoculação intraperitoneal de amostras virulentas de *B. abortus* ou *B. melitensis* resulta em 100% de letalidade dos animais até 15 dpi (Ko et al., 2002a e 2002b; Rajashakara et al., 2005). A letalidade de camundongos $IRF-1^{-/-}$ durante a infecção por amostra parental de *B. ovis* possibilitou a utilização deste modelo animal para avaliar a virulência do mutante ΔABC transportador de *B. ovis*. A infecção por cepa mutante ΔABC

transportador em camundongos IRF-1^{-/-} machos não foi letal até 21 dpi, o que confirmou a atenuação do mutante no modelo murino.

Este estudo evidencia, portanto, que a proteína ABC transportadora e o SST4 codificado pelo operon *virB* são importantes fatores patogênicos da *B. ovis*, sendo essenciais para a sobrevivência *in vivo* e infecção persistente do patógeno no modelo murino. Além disso, foi demonstrado que camundongos machos BALB/c e C57BL/6 podem ser utilizados como modelo de infecção para *B. ovis*, mas não como modelo da doença em carneiros. Por fim, foi evidenciado que camundongos IRF^{-/-} machos são susceptíveis à infecção por amostra virulenta de *B. ovis* e que servem para avaliar a virulência de cepas mutantes de *B. ovis*.

CONCLUSÃO

- O SST4 e ABC transportador, mas não a hemaglutinina, são essenciais para a patogênese e sobrevivência de *B. ovis* em modelo murino;
- Camundongos machos BALB/c e C57BL/6 são bom modelo de infecção para *B. ovis*, porém, não são um modelo da doença em carneiros;
- Camundongos machos IRF-1^{-/-} podem ser utilizados como modelo de letalidade e para avaliar o nível de virulência de amostras mutantes de *B. ovis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; et al. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris: INRA, 1988. 190p.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification, *J. Trop. Med. Hyg.* v.95 p. 271–275, 1992.

BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.367–382, 2002.

BARQUERO-CALVO, E.; CHAVESOLARTE, E.; WEISS, D.S.; et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *Plos One*, v.2, p.1–14, 2007.

BIBERSTEIN, E.L.; MCGOWAN, B.; OLANDER, H.; et al. Epididymitis in rams: studies on pathogenesis. *Cornell Vet.* v.54, p.27–41, 1964.

BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. (Eds), *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, p.351–378, 1990.

BLASCO, J.M.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; et al. Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Vet. Microbiol.*, v.14, p.381–392, 1987.

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

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

- BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, p. 435–446, 2002.
- BROWN, G.M.; RANGER, C.R.; KELLEY, D.J. Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Vet.*, v.61, p.265–280, 1971.
- BUDDLE, M.B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J. Hyg. (London)*, v.54, p.351–364, 1956.
- BULGIN, M.S. *Brucella ovis* epizootic in virgin ram lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.196, n.7, p. 1120–1122, 1990.
- BURGUESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551–575, 1982.
- BURGUESS, G.W.; SPENCER, T.L.; NORRIS, M.J. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.62, n.8, p.262–264, 1985.
- CARPENTER, T.E.; BERRY, S.L.; GLENN, J.S. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: computerized decision-tree analysis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.190, n.8, p.983–987, 1987.
- CARVALHO NETA, A.V.; STEYNEN, A.P.R.; PAIXÃO, T.A.; et al. Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.76, p.1897–1907, 2008.
- CASSATARO J., PASQUEVICH K.A., ESTEIN S.M., et al. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination *Vaccine*, v.25, n.32, p.5958–5967, 2007.
- CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M.; et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, v.198, p.545–556, 2003.
- CHAIN, P.S.; COMERCI, D. J.; TOLMASKY, M.E.; et al. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. *Infect. Immun.*, v.73, p.8353–8361, 2005.
- CHEN F.; HE, Y. Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*. *Plos One*, v.4, n.8, p. 1–13, 2009.
- CHRISTIE, P.J.; VOGEL, J.P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.*, v.8, p.354–360, 2000.
- CLEMENTINO, I.J.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; et al. Inquérito soropidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* v.27, n.4, p.137–143, 2007.
- COMERCI, D.J.; MARTINEZ-LORENZO, M.J.; SIEIRA, R.; et al. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell. Microbiol.*, v.3, n.3, p.159–168, 2001.
- DANESE, I.; HAINE, V.; DELRUE R.M.; et al. The Ton system, an ABC transporter, and a universally conserved GTPase are involved in iron utilization by *Brucella melitensis* 16M. *Infect. Immun.*, v.72, n.10, p.5783–5790, 2004.
- DE B.K., STAUFFER L., KOYLASS M.S., et al. Characterization of a novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic

- breast implant infection. *J. Clin. Microbiol.* v.46, p.43–49, 2008.
- DE JONG, M.F.; SUN, Y.H.; DEN HARTIGH, A.B.; et al. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulation that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* v.70, p.1378–1396, 2008.
- DELVECCHIO, V.G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R.J.; et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.443–448, 2002.
- DEN HARTIGH, A.B.; SUN, Y.H.; SONDERVAN, D.; et al. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.72, p.143–149, 2004.
- ENRIGHT, F.M.; ARAYA, L.N.; ELZER, P.H.; et al. Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.26, n.2, p.171–182, 1990.
- FERNANDES, D.M.; JIANG, X.; JUNG, J.H.; et al. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.16, p.193–203, 1996.
- FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO J.M.; et al. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rum. Res.* v.29, p.13–19, 1998.
- FICHT, T.A. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.* v.92, n.3, p. 213–223, 2003.
- FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J.; et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.57, n.11, p.2688–2693, 2007.
- FRANCO, M.P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; et al. Human brucellosis. *Lancet Infect. Diseases*, v.7, n.12, p.775–786, 2007.
- GARMORY, H.S.; TITBALL, R.W. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect. Immun.* v.72, p.6757–6763, 2004.
- GODFROID, F.; CLOECKAERT, A.; TAMINIAU, B.; et al. Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (wbk). *Res. Microbiol.* v.151, p.655–668, 2000.
- GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* v.36, p.313–326, 2005.
- GOMES, M.J.P.; DRIEMEIER, D.; EIDT, M.; et al. Epididimite ovina: isolamento de *Actinobacillus seminis*, no RS. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.29, n.1, p.55–58, 2001.
- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* v.90, p.281–297, 2002.
- GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Rec.*, v.144, p.555–558, 1999.

- GUZMAN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; et al. The two-component system BvrRBvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of the outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rizhobiaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, n.19, p.12375–12380, 2002.
- HALLING, S.M.; BRICKER, B.J. Characterization and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of *Brucella* spp.: Bru-RS1 and Bru-RS2. *Mol. Microbiol.* v.14, p.681–689, 1994.
- HALLING, S.M.; PETERSON-BURCH, B.D.; BRICKER, B.J.; et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, v.187, p.2715–2726, 2005.
- HARLAND, D.N.; GARMORY, H.S.; BROWN, K.A.; et al. An association between ATP binding cassette systems, genome sizes and lifestyles of bacteria. *Res. Microbiol.*, v.156, n.3, p.434–442, 2005.
- HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Vet. J.*, v.50, n.3, p.179–180, 1997.
- HOMSE, A.C.; CASARO, A.P.; CAMPERO, C.M.; et al. Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, v.75, n.4, p.302–306, 1994.
- HONG, P.C.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, v.68, p.4102–4107, 2000.
- IZADJOO, M.J.; BHATTACHARJEE, A.K.; PARANAVITANA, C.M.; et al. Oral Vaccination with *Brucella melitensis* WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent *Brucella melitensis* 16M. *Infect. Immun.*, v.72, p.4031–4039, 2004.
- IZADJOO, M.J.; MENSE, M.G.; BHATTACHARJEE, A.K.; et al. A study on the use of male animal models for developing a live vaccine for brucellosis. *Transbound. Emerg. Dis.*, v.55, n.3-4, p.145–151, 2008.
- JAHANS, K.L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E.S. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet. Microbiol.*, v.57, n.4, p.373–382, 1997.
- JENNER, D.C.; DASSA, E.; WHATMORE, A.M.; et al. ATP-Binding Cassette Systems of *Brucella*. *Comp. Funct. Genomics*, v.2009, p.1–16, 2009.
- JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P.; ELZER, P.H.; BLASCO, J.M.; et al. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.*, v.62, n.2, p.632–638, 1994.
- JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; et al. Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine* v.11, n.1, p.61–66, 1993.
- JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; et al. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect. Immun.* v.72, p.2429–2433, 2004.
- KAHL-MCDONAGH, M.M.; ARENAS-GAMBOA, A.M.; FICHT, T.A. Aerosol Infection of BALB/c mice with *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* and protective efficacy against aerosol challenge. *Infect. Immun.*, v.75, n.10, p.4923–4932, 2007.

- KIM, S.; LEE, D.S.; WATANABE, K.; et al. Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice *BMC Microbiol.*, v.5, n.22, 2005.
- KO, J.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; FICHT, T.A.; et al. Virulence Criteria for *Brucella abortus* Strains as Determined by Interferon Regulatory Factor 1-Deficient Mice. *Infect. Immun.*, v.70, p.7004–7012, 2002a.
- KO, J.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; SPLITTER, G.A. Susceptibility of IFN Regulatory Factor-1 and consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *J. Immunol.* v.168, p.2433–2440, 2002b.
- KO, J.; SPLITTER, G.A. *Brucella abortus* tandem repeated ATP-binding proteins, BapA and BapB, homologs of *Haemophilus influenzae* LktB, are not necessary for intracellular survival. *Microb. Pathog.*, v.29, p.245–253, 2000.
- KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin. Microbiol. Review*, v.16, p.65–78, 2003.
- LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, p.60–66, 2005.
- LIBAL, M.C.; KIRKBRIDE, C.A. *Brucella ovis*-induced abortion in ewes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.183, n.5, p.553–554, 1983.
- LÓPEZ-GOÑI, C.; GUZMÁN-VERRI, L.; MANTEROLA, A.; et al. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS, *Vet. Microbiol.*, v.90, p.329–339, 2002.
- MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* v.16, p.75–79, 1996.
- MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.65–72, 2003.
- MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; CLOECKAERT, A. Marine mammal *Brucella* isolates with different genomic characteristics display a differential response when infecting human macrophages in culture *Microbes Infect.*, v.11, n.3, p.361–366, 2009.
- MARÍN, C.M.; JIMENEZ DE BÁGUES, M.P.; BLASCO, J.M.; et al. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.*, v.125, n.20, p.504–508, 1989.
- 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 de Mestrado)
- MCFARLANE, D.; SALISBURY, R.M.; OSBORNE, H.G.; et al. Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Aust. Vet. J.*, v.28, p. 221–226, 1952.
- MCGOWAN, B.; SCHULTZ, G. Epididymitis in rams. I. Clinical description and field aspects. *Cornell Vet.*, v.46, p.277–281, 1956.
- MEINERSHAGEN, W.A.; FRANK, F.W.; WALDHALM, D.G. *Brucella ovis* as a cause of abortion in ewes. *Am. J. Vet. Res.*, v.35, n.5, p.723–724, 1974.

- MENSE, M.G.; VAN DE VERG, L.L.; BHATTACHARJEE, A.K.; et al. Bacteriologic and histologic features in mice after intranasal inoculation of *Brucella melitensis*. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, n.3, p.398–405, 2001.
- MONTARAZ, J.A.; WINTER, A.J. Comparison of living and non living vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, v.53, p.245, 1986.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN I. *Brucella* evolution and taxonomy *Vet. Microbiol.*, v.90, p.209–227, 2002.
- MORYON, I. *Estructura antigenic del genero Brucella*. Zaragoza: Instituto Agronomico Mediterraneo de Zaragoz, p.39–53, 1988.
- MURPHY, E.A.; SATHIYASEELAN, J.; PARENT, M.A.; et al. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunol.*, v.103, p.511–518, 2001.
- MYERS D.M. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Applied Microbiol.*, v.26, n.6, p.855–857, 1973.
- MYERS, D.M.; JONES, L.M.; VARELA-DIAZ, V.M. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Applied Microbiol.*, v.23, p.894–902, 1972.
- NOZAKI, C.N.; MEGID, J.; LIMA, K.C.; et al. Comparação das técnicas de Imunodifusão em gel Agar e ELISA no diagnóstico de brucelose ovina em cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.71, n.1, p.1–5, 2004.
- O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* *VirB* and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.*, v.33, p.1210–1220, 1999.
- OLSEN, S.C.; WATERS, W.R.; STOFFREGEN, W.S. An Aerosolized *Brucella* spp. Challenge Model for Laboratory Animals. *Zoonoses and Public Health*, v.54, n.8, p.281–285, 2007.
- PAIXÃO, T.A.; ROUX, C.M.; DEN HARTIGH, A.B.; et al. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide *Infect. Immun.*, v. 77, p. 4197–4208, 2009.
- PAOLICCHI, F. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta inmune antiespermática. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, v.82, n.2, p.86–88, 2001.
- PASQUALI, P.; ROSANNA, A.; PISTOIA, C.; et al. *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain *B. abortus* 2308. *Infect. Immun.*, v.71, p.2326–2330, 2003.
- PAULSEN, I.; SESHADRI, R.; NELSON, K.; et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.13148–13153, 2002.
- PEI, J.; TURSE, J.E.; WU, Q.; et al. *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. *Infect. Immun.*, v.74, p.2667–2675, 2006.

- PERRY, Q.L.; HAGIUS, S.D.; WALKER, J.V.; et al. Evaluating the virulence of a *Brucella melitensis* hemagglutinin gene in the caprine model. *Vaccine*, v.28S, p.F6–F11, 2010.
- RAJASHEKARA, G.; KREPPS, M.; ESKRA, L.; et al., Unraveling *Brucella* genomics and pathogenesis in immunocompromised IRF-1^{-/-} mice. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.54, n.6, p.358–368, 2005.
- REDWOOD, D.W.; CORBEL, M.J. Interaction of *Brucella ovis* with ovine tissue extracts. *Vet. Rec.*, v.113, n.10, p.220, 1983.
- RIDLER, A.L.; WEST, D.M.; STAFFORD K.J.; et al. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. *New Zealand Vet. J.*, v.48, p.57–59, 2000
- ROBINSON, A. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. In: Animal Production and Health Division, FAO. n.156, Rome, 2003.
- ROCHA-GRACIA, R.C.; CASTAÑEDA-ROLDA E.I.; GIONO-CEREZO S.; et al. *Brucella* sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol. Letters*, v.213, p.219–224, 2002.
- ROLAN, H.G.; TSOLIS, R.M. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus virB* mutant colonization. *Infect. Immun.*, v.75, p.2965–2973, 2007.
- ROLÁN, H.G.; XAVIER, M.N.; SANTOS, R.L.; et al. Natural antibody contributes to host defense against an attenuated *Brucella abortus virB* mutant. *Infect. Immun.* v.77, p.3004–3013, 2009.
- ROSINHA, G.M.S.; FREITAS, D.A.; MIYOSHI, A.; et al. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect. Immun.* v.70, p.5036–5044, 2002.
- SANTOS, R.L., POESTER, F.P., LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.42–56, 2005.
- SANTOS, R.L.; SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; SAMARTINO, L.E. Brucelose: Zoonose e Bioterrorismo. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.83–98, 2005.
- SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E.; WHATMORE, A.M.; QUANCE, C.R.; et al. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J. Med. Primatology*, v.38, p.70–73, 2009.
- SCHOLZ, H.C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60: 801–808, 2010.
- SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.58, p.375–382, 2008.
- SEARSON, J.E. The distribution of histopathological lesions in rams reacting in a complement fixation test for *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.64, n.4, p.108–109, 1987.
- SERGEANT, E.S.G. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. *New Zealand Vet. J.*, v.42, p.97–100, 1994.
- SIEIRA, R.; COMERCI, D. J.; SANCHEZ, D.O.; et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence

- and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.*, v.182, n.17, p.849–855, 2000.
- SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; BORGES, A.M.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.1–12, 2005.
- SIMMONS, G.C.; HALL, W.T.K. Epididymitis in rams. *Aust. Vet. J.*, v.29, p.33–40, 1953.
- SMITHER, S.J.; PERKINS, S.D.; DAVIES, C.; et al. Development and characterization of mouse models of infection with aerosolized *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.16, n.5, p.779–783, 2009.
- SOHN, A.H.; PROBERT, W.S.; GLASER, C.A.; et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infect. Diseases* v.9, n.4, p.485–488, 2003.
- STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; PUGH, JR, G.W.; et al. Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect. Immun.*, v.62, p.3206–3212, 1994.
- SUN, Y.H.; DEN HARTIGH, A.B.; SANTOS, R.L.; et al. *virB*-Mediated Survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages. *Infect. Immun.*, p.4826–4832 v.70, n.9, 2002.
- SUN, Y.H.; DEN HARTIGH, A.B.; TSOLIS, R.M., et al. Laboratory maintenance of *Brucella abortus*. *Curr. Protoc. Microbiol.*, chap.3, unit. 3B.1, 2005.
- TAM, R., SAIER JR, M.H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.*, v.57, p.320–346, 1993.
- TATUM, F.M., DETILLEUX, P.G.; SACKS, J.M.; et al. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect. Immun.*, v.60, p.2863–2869, 1992.
- THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. (Eds). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, p.236–247, 1993.
- TOBIAS, L.; CORDES, D.O.; SCHURIG, G.G. Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. *Vet. Pathol.*, v.30, p.119–129, 1993.
- TSOLIS, R.M. Comparative genome analysis of the alpha-proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, n.20, p.12503–12505, 2002.
- TSOLIS, R.M.; SECHADRI, R.; SANTOS, R.L.; et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PloS One*, v.4, n.5, p.1–9. 2009.
- VAN RENSBURG, S.W.J.; VAN HEEDEN, K.M.; LE ROUX, D.J.; et al. Infectious infertility in rams. *J South African Vet. Med. Assoc.*, v.29, p.223–233, 1958.
- VERGER, J.M. et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.35, p.292–295, 1985.
- VERGER, J.M.; GRAYON, M.; TIBOR A.; et al. Differentiation of *Brucella melitensis*,

B. ovis and *B. suis* biovar 2 strains by use of membrane protein or cytoplasmic protein-specific gene probes. *Res. Microbiol.*, v.149, n.7, p.509–517, 1998.

VIGLIOCCO, A.M.; SILVA PAULO, P.S.; MESTRE, J.; et al. Development and validation of the indirect enzyme immunoassay for the detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, v.54, p.357–368, 1997.

VIZCAÍNO, N.; CARO-HERNÁNDEZ, P.; CLOECKAERT, A.; et al. DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect* v.6, p.821–834, 2004.

WALKER, R.L.; LEAMASTER, B.R.; STELLFLUG, J.N.; et al. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.188, n.4, p.393–396, 1986.

WATTAM, A.R. WILLIAMS, K.P.; SNYDER, E.E.; et al. Analysis of ten

Brucella genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J. Bacteriol.*, v.191, n.11, p.3569–3579, 2009.

XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; et al. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural*, v.39, n.7, p.2252–2260, 2009.

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

XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; et al. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, 2010, no prelo. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.037.

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

Anexo 1: Resultado de colonização bacteriana (Log UFC) em órgãos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *B. ovis*.

		Dias pós infecção			
BAÇO		1	7	30	90
BALB/c	média ± dp	6,568 ± 0,133	7,778 ± 0,298	6,449 ± 0,231	4,812 ± 0,286
C57BL/6		7,181 ± 0,410	7,039 ± 0,254	5,104 ± 1,029	4,344 ± 0,617
FÍGADO		1	7	30	90
BALB/c	média ± dp	4,382 ± 0,268	6,419 ± 0,593	3,841 ± 0,235	2,748 ± 0,847
C57BL/6		4,973 ± 0,613	5,731 ± 0,471	3,612 ± 0,854	1,171 ± 0,052
TESTÍCULOS		1	7	30	90
BALB/c	média ± dp	3,494 ± 0,325	4,938 ± 0,286	2,301 ± 0,865	1,301 ± 0,0
C57BL/6		4,021 ± 0,198	3,964 ± 0,859	1,376 ± 0,150	1,301 ± 0,0
EPIDÍDIMOS		1	7	30	90
BALB/c	média ± dp	4,099 ± 0,331	2,261 ± 0,503	3,941 ± 0,211	1,947 ± 0,774
C57BL/6		4,675 ± 0,236	3,203 ± 0,512	2,881 ± 2,0825	1,301 ± 0,0
VES. SEM.		1	7	30	90
BALB/c	média ± dp	3,4855 ± 0,557	3,459 ± 1,542	2,091 ± 1,385	3,496 ± 1,647
C57BL/6		4,009 ± 0,145	4,178 ± 0,62	1,301 ± 0,0	1,709 ± 0,8167

dp- desvio padrão; Ves.sem.- vesícula seminal.

Baço e Fígado- Log UFC/g de órgão

Testículos, epidídimos e vesícula seminal- Log UFC total

Anexo 2: Resultado de colonização bacteriana (Log UFC/g) de baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com a amostra de referência (n=8) ou mutantes de *B. ovis* (n=4).

		Dias pós infecção			
BAÇO		1	7	30	90
WT	média ± dp	7,285 ± 0,233	7,732 ± 0,378	6,468 ± 0,173	5,429 ± 0,728
Δhemglut.		7,727 ± 0,119	7,553 ± 0,369	6,180 ± 0,229	4,563 ± 1,119
ΔvirB2		3,643 ± 0,133	3,896 ± 1,184	3,175 ± 1,252	2,473 ± 0,076
ΔABC trans.		3,577 ± 0,050	3,913 ± 1,599	2,600 ± 0,358	2,495 ± 0,131
FÍGADO		1	7	30	90
WT	média ± dp	5,537 ± 0,321	6,482 ± 0,369	3,986 ± 0,384	2,922 ± 0,841
Δhemglut.		5,946 ± 0,210	6,476 ± 0,992	3,862 ± 0,109	3,279 ± 1,194
ΔvirB2		2,308 ± 0,046	1,304 ± 0,030	1,285 ± 0,072	1,262 ± 0,121
ΔABC trans.		2,420 ± 0,136	1,321 ± 0,026	1,341 ± 0,018	1,202 ± 0,050

WT- *B. ovis* ATCC 25840; Δhemglut- Δhemaglutinina de *B. ovis*

ΔABC trans.- ΔABC transportador de *B. ovis*; desvpad- desvio padrão

