

**Teane Milagres Augusto da Silva**

**PAPEL DO TRANSPORTADOR ABC ESPECÍFICO  
DE *BRUCELLA OVIS* EM SUA SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR  
E EXPRESSÃO DE FATORES DE PATOGENICIDADE**

Tese apresentada à UFMG, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

**Curso:** Doutorado em Ciência Animal

**Área de Concentração:** Patologia Animal

**Orientador:** Renato de Lima Santos

**Coorientadores:** Renee M. Tsolis e Tatiane Alves da Paixão

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária- UFMG  
2014**

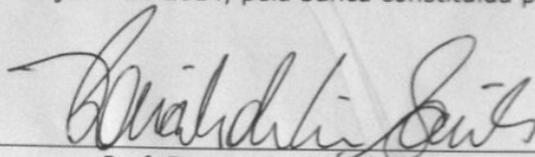


## FOLHA DE APROVAÇÃO

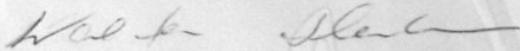
**TEANE MILAGRES AUGUSTO DA SILVA**

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovada em 22 de julho de 2014, pela banca constituída pelos membros:



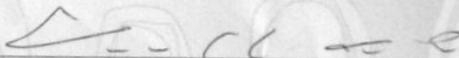
Prof. Renato de Lima Santos  
Presidente - Orientador



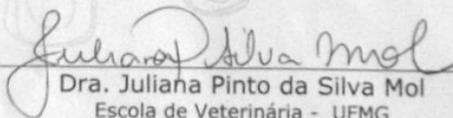
Prof. Walter Lilenbaum  
Universidade Federal Fluminense



Prof. Rinaldo Aparecido Mota  
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Escola de Veterinária - UFMG



Dra. Juliana Pinto da Silva Mol  
Escola de Veterinária - UFMG





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

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao professor Renato Santos, que me orientou por oito anos e me permitiu construir minha trajetória profissional como pesquisadora.

À professora Renee Tsohis, pela co-orientação durante todo o doutorado e, em especial, por tornar o doutorado sanduíche em Davis uma rica e feliz experiência de vida.

À professora Tatiane Paixão, pela co-orientação e auxílio durante o doutorado, e pela oportunidade que me ofereceu de iniciar na área acadêmica, como professora voluntária.

À professora Héliida Andrade, pela grande colaboração na análise proteômica e por disponibilizar seu laboratório para este trabalho.

Aos colaboradores deste trabalho, em especial Maria, Vidya, Mariana, Juliana e Simone, que me ajudaram nos experimentos, me ensinaram novas técnicas laboratoriais e com quem tive a grata oportunidade de conviver.

Aos colegas de laboratório da UC Davis, da Escola de Veterinária- UFMG e do laboratório de proteômica do ICB-UFMG, que foram essenciais para adquirir novos conhecimentos e, principalmente, por tornar os quatro anos de doutorado mais suaves e felizes.

A minha família, aos amigos e amor, pelo apoio e estímulo de seguir sempre adiante frente a qualquer desafio, especialmente durante o doutorado sanduíche.

À CAPES pela bolsa durante o doutorado na UFMG e ao CNPq e UC Davis, pelo auxílio financeiro durante o doutorado sanduíche.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1. O gênero <i>Brucella</i> .....	17
2.2. Infecção por <i>Brucella ovis</i> .....	18
2.3. Análise genômica de <i>Brucella ovis</i> .....	20
2.4. Fatores de patogenicidade de <i>Brucella</i> spp. e seus reguladores.....	22
2.4.1. Sistema de Secreção Tipo 4 (SST4).....	22
2.4.2. Sistema transportador ABC.....	24
2.4.3. Outros fatores de patogenicidade.....	25
2.5. Tráfego intracelular de <i>Brucella</i> spp.....	26
2.6. Análise proteômica do gênero <i>Brucella</i> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Manipulação e cultivo bacteriano.....	31
4.2. Clonagem e complementação.....	32
4.3. Análise genômica e <i>in vitro</i> do transportador ABC.....	33
4.4. Avaliação do transportador ABC de <i>B. ovis</i> em <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	35
4.5. Cultivo e infecção <i>in vitro</i> de linhagens celulares HeLa e RAW.....	36
4.6. Análise do tráfego intracelular por microscopia confocal.....	36
4.7. Análise de expressão do SST4 por <i>Western blot</i> .....	37
4.8. Indução <i>in vitro</i> do SST4 por ácido urocânico.....	37
4.9. RT-PCR em tempo real do SST4 durante crescimento <i>in vitro</i> .....	38
4.10. Análise estatística.....	38
4.11. Análise proteômica de <i>B. ovis</i> e mutante $\Delta abcAB$ .....	39
4.11.1. Extração de proteínas.....	39
4.11.2. Análise proteica por gel bidimensional.....	40
4.11.3. Eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE).....	40
4.11.4. Análise de DIGE através do programa DeCyder.....	41
4.11.5. Extração de proteína em spot do gel DIGE.....	42
4.11.6. Espectrometria de massa.....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1. Confirmação do fenótipo de <i>B. ovis</i> $\Delta abcAB$ após mutagênese.....	43
5.2. Predição do sistema ABC em <i>B. ovis</i> através de análise genômica.....	43
5.3. Níquel não interfere no crescimento <i>in vitro</i> do mutante $\Delta abcAB$ .....	44
5.4. Expressão <i>in vitro</i> do transportador ABC de <i>Brucella ovis</i> em <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	45
5.5. O transportador ABC específico de <i>Brucella ovis</i> é necessário para a sua multiplicação intracelular em células epiteliais HeLa.....	48
5.6. O mutante $\Delta abcAB$ de <i>Brucella ovis</i> não é capaz de evadir da fusão fagolisossomo.....	50
5.7. O transportador ABC de <i>Brucella ovis</i> interfere na expressão do sistema de	

secreção tipo IV.....	52
5.8. A regulação do SST4 via transportador ABC é a nível pós-transcricional.....	54
5.9. Reprodutibilidade do perfil proteico de <i>Brucella ovis</i> cultivada <i>in vitro</i> .....	56
5.10. <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcAB$ apresenta diferenças qualitativas e quantitativas de volume de <i>spots</i> em eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE).....	58
5.11. Predição de interação entre as proteínas identificadas em cada grupo experimental.....	65
5.12. Transportador ABC de <i>Brucella ovis</i> interfere na expressão de proteínas de diversos grupos funcionais.....	65
5.12.1. Proteínas transportadoras ABC.....	65
5.12.2. Proteínas de membrana.....	69
5.12.3. Resposta ao estresse metabólico.....	70
5.12.4. Metabolismo e biossíntese.....	70
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7. TABELAS SUPLEMENTARES.....</b>	<b>72</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>

---

#### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Descrição e referência das amostras de bactérias e plasmídeos utilizados neste estudo.....	34
Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados em PCR convencional para a confirmação de mutagênese em <i>Brucella ovis</i> e <i>Salmonella</i> Typhimurium (STm).....	34
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para RT-PCR em Tempo Real para RNAm de <i>Brucella ovis</i> .....	39
Tabela 4 - Mistura de proteínas de <i>Brucella ovis</i> utilizada para eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE).....	42
Tabela 5 - Classificação funcional de proteínas com expressão diminuída em <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcAB$ ( $p < 0,05$ ).....	63
Tabela 6 - Classificação funcional de proteínas com expressão aumentada ( $p < 0,05$ ) em <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcAB$ .....	64
Tabela S1 - <i>Spots</i> de proteínas com expressão diminuída em $\Delta abcAB$ de <i>Brucella ovis</i> .....	72
Tabela S2 - <i>Spots</i> de proteínas com expressão aumentada em $\Delta abcAB$ de <i>Brucella ovis</i> .....	75
Tabela S3 - <i>Spots</i> não identificados por espectrometria de massa.....	76

---

## FIGURAS

---

- Figura 1 - **Ilustração do plasmídeo pTSabc.** Locus *abcABCDE* de *Brucella ovis* (5,6 Kb), que potencialmente codifica um transportador ABC, foi amplificado e inserido no plasmídeo de expressão pBBR1-MCS4, Amp<sup>R</sup>. 6His= cauda de histidina codificada na extremidade C-terminal da proteína AbcA; *KpnI*, *SpeI*= enzimas de restrição no sítio de inserção; Amp= cassete de resistência à ampicilina. M13= sítio iniciador de amplificação para sequenciamento..... 35
- Figura 2 - **Sobrevivência intracelular de *Brucella ovis* e mutante  $\Delta abcAB$  em linhagem celular RAW 264.7 de macrófagos murino.** Macrófagos foram infectados com MOI 1:100 de *B. ovis* WT ou  $\Delta abcAB$ . As amostras foram avaliadas quanto à sobrevivência intracelular após 0, 4, 8 e 24 horas de infecção (hpi). *B. ovis* WT é capaz de multiplicar em macrófagos RAW, enquanto mutante  $\Delta abcAB$  não sobreviveu intracelularmente. Dados representam média geométrica e erro padrão de dois experimentos independentes. Diferença significativa entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$  está indicada por asteriscos (\*\*\*) $p < 0,001$ )..... 43
- Figura 3 - **Ilustração do sistema ABC de importação e de genes em *Brucella ovis* que potencialmente codificam as proteínas estruturais.** Os genes *abcA* e *abcB* codificam proteínas ligadoras à ATP (ATPase) presentes no citoplasma. Os genes *abcC* e *abcD* codificam proteínas de transmembrana (TM) em  $\alpha$ -hélice, formando o poro. O gene *abcE* codifica a proteína ligadora ao substrato (PLS), localizada no periplasma, sugerindo que o sistema ABC *abcA-E* de *B. ovis* está associado à importação de substrato. ME= membrana externa; MI= membrana interna. Referência: van der Heide e Poolman, 2002, com modificações..... 44
- Figura 4 - **Crescimento *in vitro* de *Brucella ovis* e mutante  $\Delta abcAB$ .** (A) Soro fetal bovino (SFB) a 2%, 5% ou 10% foi acrescentado ao meio líquido TSB e, após 24 horas, o crescimento bacteriano foi mensurado através de leitura OD<sub>600</sub>. A adição de SFB favoreceu igualmente o crescimento *in vitro* das amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*. (B) A suplementação do meio TSB+10% SFB com níquel (NiSO<sub>4</sub> a 0,5, 1 ou 2 mM) não favoreceu crescimento do mutante  $\Delta abcAB$  após 48hs. Cátions bivalente, inclusive níquel, foram quelados com EDTA (10, 25 ou 50 mM) em meio líquido, o que limitou o crescimento de ambas as amostras. Dados representam média e erro padrão de três experimentos independentes..... 46
- Figura 5 - **A deleção dos três transportadores ABC não compromete o metabolismo *in vitro* de *Salmonella Typhimurium* (STm) em meio mínimo ou suplementado com aminoácidos.** STm WT e mutante STm $\Delta 3$  sem os três principais transportadores ABC (Opp/Dpp/Tpp) foram incubados a 37°C em placa de 96 poços com meio mínimo M9 com cloreto de tetrazólio (TTC), suplementado ou não com 20 mM de aminoácidos (aa). Gráfico representa um experimento..... 47
- Figura 6 - **O transportador ABC codificado por *abcA-E* de *Brucella ovis* não é capaz de importar peptídeos tóxicos em *Salmonella Typhimurium***

**LT2** (A) As amostras *S. Typhimurium* (STm WT), triplo mutante para transportadores ABC (STm $\Delta$ 3) e mutante complementado com transportador *abcA-E* de *B. ovis* (STm $\Delta$ 3-comp) foram cultivadas em meio mínimo contendo disco com tri-lisina (0,2 mg e 0,4 mg) ou alafosfalina (0,5 mg e 1 mg). Ambos STm $\Delta$ 3 e STm $\Delta$ 3-comp foram resistentes aos peptídeos tóxicos, enquanto STm WT foi susceptível. Figura é representativa de três experimentos independentes. (B) Susceptibilidade de STm WT aos peptídeos tóxicos foi mensurada (mm) entorno do disco. Dados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. (C) *Western blot* anti-histidina ( $\alpha$ -his) em STm $\Delta$ 3-comp durante crescimento *in vitro*. A cauda de histidina presente na extremidade C-terminal da proteína *abcA* (~37 kDa) confirma a expressão do transportador ABC em STm..... 48

Figura 7 - **Sobrevivência intracelular de *Brucella ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$  em linhagem de células epiteliais HeLa.** Células HeLa foram infectadas com MOI 1:1000 de *B. ovis* WT ou  $\Delta abcAB$  (A) ou por mesmas amostras com expressão de fluorescência *mCherry* (B). As amostras foram avaliadas quanto à sobrevivência intracelular após 0, 8, 24 e 48 horas de infecção (hpi). *B. ovis* WT foi capaz de multiplicar em células HeLa até 48 hpi, enquanto mutante  $\Delta abcAB$  não sobreviveu intracelularmente. Dados representam media geométrica e erro padrão de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$  está indicada por asteriscos (\*\*\*) $p < 0,001$ )..... 49

Figura 8 - **Transportador ABC permite que *Brucella ovis* escape da fusão fagolisossomal e sobreviva intracelularmente em células HeLa.** (A) Ilustração representativa do tráfego intracelular por microscopia confocal de *B. ovis* WT (painel superior) e mutante  $\Delta abcAB$  (painel inferior) que expressam *mCherry* (vermelho) durante a infecção de células HeLa. *B. ovis  $\Delta abcAB$  colocaliza com compartimento positivo para LAMP-1 (verde) até 48 horas, não sendo capaz de sobreviver. No entanto, *B. ovis* WT é capaz de escapar do lisossomo e multiplicar até 48 horas. (B) Média percentual de vacúolo contendo *Brucella* (VCB) que são positivos para LAMP-1 durante a infecção por WT (coluna preta) ou  $\Delta abcAB$  (linha vermelha) de *B. ovis*. (C) Média do número de bactérias por célula contadas (total 100 células por tempo) durante o curso da infecção. Dados representam media e desvio padrão de pelo menos 100 células de três experimentos independentes. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )..... 51*

Figura 9 - **Transportador *abcA-E* é necessário para a expressão de proteínas do sistema de secreção tipo IV (SST4) em *Brucella ovis*.** (A) *Western blot* de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  cultivadas em meio líquido rico (coluna esquerda) e transferidas para meio mínimo ácido (coluna direita). Proteínas VirB8 (painel superior) e VirB11 (painel inferior) foram expressas intensamente somente na amostra WT em ambos os meios, sendo a expressão de SST4 independente de baixo pH em *B. ovis*. Mutante  $\Delta abcAB$  apresenta fraca expressão de proteínas VirB, inclusive em meio mínimo ácido. (B) *Western blot* anti-VirB8 e anti-VirB9 de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  cultivadas em placa contendo meio rico TSA com 5% de sangue ovino. Colunas à esquerda demonstram concentração proteica similar das amostras lisadas. Figura de um experimento representativo de três experimentos independentes..... 53

- Figura 10 - **A adição de ácido urocânico ao meio mínimo ácido não induz a expressão do SST4 no mutante  $\Delta abcAB$  de *Brucella ovis*.** (A) *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  foram transferidas para meio mínimo E com pH 5,0, suplementado ou não com ácido urocânico ou ácido glutâmico (controle interno). Após 4 horas de incubação, a expressão *in vitro* de VirB8 (26 kDa) foi avaliada por *Western blot*. (B) Eletroforese de cada amostra (5  $\mu$ L) em gel SDS-PAGE a 12% e corada por *Coomassie Brilliant Blue*, para confirmar a concentração proteica. Figura representativa de três experimentos independentes..... 54
- Figura 11 - **A regulação do sistema de secreção tipo IV (SST4) via transportador ABC em *Brucella ovis* é a nível pós-transcricional.** Níveis de RNA mensageiro de *virB1*, *virB8*, *vjbR* e *hutC* foram mensurados por RT-PCR em tempo real, após crescimento *in vitro* de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  em meio líquido rico (TSB +10% SFB). Para confirmar a deleção pontual no mutante  $\Delta abcAB$ , a transcrição dos genes *abcA* e *abcC* foi analisada. Dados representam média geométrica e erro padrão dos valores de Ct de WT em relação ao mutante  $\Delta abcAB$  de três experimentos independentes. \*\*\*p= 0,00035..... 55
- Figura 12 - **Avaliação da qualidade proteica de *Brucella ovis* e  $\Delta abcAB$  cultivadas *in vitro* através de SDS-PAGE.** Três amostras independentes de *B. ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$  foram cultivadas por três dias em meio rico TSA com 10% de hemoglobina, seguida de extração proteica. Eletrofores das amostras proteicas (1,5  $\mu$ L cada) em gel SDS-PAGE a 12% e coradas por *Coomassie Brilliant Blue*. A qualidade e padrão proteico foram similares entre todas as amostras analisadas..... 56
- Figura 13 - **Perfil proteico e diagrama de dispersão da intensidade dos spots entre as triplicatas de WT (painel superior) e de  $\Delta abcAB$  (painel inferior) de *Brucella ovis* durante crescimento *in vitro*.** A) Géis 2D de SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue* demonstram o perfil proteico de *B. ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$  em gel *Master* (amostras WT1 e abc1), utilizando tiras IPG de 18 cm, pH 4 a 7. (B) Comparação da intensidade dos spots obtidas entre o gel *Master* e as triplicatas de WT (painel superior) e de  $\Delta abcAB$  (painel inferior) através do programa *ImageMaster™ 2D Platinum*. Correlação: WT1 e WT2= 0,944; WT1 e WT3= 0,951;  $\Delta abc1$  e  $\Delta abc2$ = 0,902;  $\Delta abc1$  e  $\Delta abc3$ = 0,881..... 57
- Figura 14 - **Perfil proteico de *Brucella ovis* WT e  $\Delta abcAB$  durante cultivo *in vitro* obtido pela eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE).** Imagens fluorescentes de gel 2D SDS-PAGE a 12% com tiras de IPG de 18 cm, pH 4 a 7, contendo proteínas de WT marcadas com Cy5 (vermelho) e proteínas de  $\Delta abcAB$  marcadas com Cy3 (verde). Uma mistura de ambas as amostras foi marcada com Cy2 (azul) e utilizada como normalizador para DIGE. A sobreposição das imagens de WT e  $\Delta abcAB$  permite visualizar spots com diferenças qualitativas de expressão entre as amostras (setas). Figura é representativa de um único gel..... 60

- Figura 15 - **Mapa proteico e análise de componentes principais (PCA) de spots diferentemente expressos em *Brucella ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$ .** (A) *Heat map* ilustra intensidade média de expressão de 100 spots em *B. ovis*  $\Delta abcAB$  (esquerda) e WT (direita) em relação ao normalizador. Cada linha corresponde a um spot com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de expressão entre os grupos. (B) Visualização do padrão de distribuição dos 100 spots através de PCA, sendo seis spots identificados como *outliers*. Delimitação oval contém amostras com 95% de confiança. Números correspondem aos spots identificados na Figura 16. (C) Padrão de distribuição das amostras obtidas em quatro géis em relação aos grupos WT e  $\Delta abcAB$ ..... 61
- Figura 16 - **Seleção de spots proteicos diferentemente expressos em *Brucella ovis* e mutante  $\Delta abcAB$  através de eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE).** (A) Géis bidimensionais SDS-PAGE 12% corados por *Coomassie brilliant blue* (IPG pH 4-7, 7 cm) demonstram spots de proteínas selecionados para identificação por espectrometria de massa. Spots selecionados da amostra WT (esquerda) apresentam expressão diminuída em  $\Delta abcAB$  e spots selecionados da amostra  $\Delta abcAB$  (direita) apresentam expressão aumentada. (B) Figuras 3D representativas de spots com expressão diminuída (esquerda) e aumentada (direita) no mutante  $\Delta abcAB$ ..... 62
- Figura 17 - **Predição de possíveis interações entre proteínas com expressão diminuída em *Brucella ovis*  $\Delta abcAB$ .** Total de 22 proteínas (quadrado vermelho) identificadas em géis de *B. ovis* WT apresentavam expressão diminuída em comparação a *B. ovis* WT. Números correspondem à identificação dos spots. Asterisco representa proteínas identificadas que foram anotadas como pseudogenes em *B. ovis*. Linhas representam possíveis associações entre proteínas, de acordo com tipos de evidências: verde – vizinhança; vermelho – fusão gênica; azul – co-ocorrência; preto – co-expressão; roxo – dados experimentais; azul claro – base de dados; amarelo – publicações..... 66
- Figura 18 - **Predição de possíveis interações entre proteínas com expressão aumentada em *Brucella ovis*  $\Delta abcAB$ .** Total de nove proteínas (quadrado vermelho) identificadas em géis de *B. ovis*  $\Delta abcAB$  apresentavam expressão aumentada em comparação a *B. ovis* WT. Números correspondem à identificação dos spots. Linhas representam possíveis associações entre proteínas, de acordo com tipos de evidências: verde – vizinhança; vermelho – fusão gênica; azul – co-ocorrência; preto – co-expressão; roxo – dados experimentais; azul claro – base de dados; amarelo – publicações..... 68

---

## ABREVIATURAS

---

6His= cauda de histidina  
ABC= *ATP binding cassette*  
Amp<sup>R</sup>= resistente à ampicilina  
BOPI-1= ilha de patogenicidade 1 de *Brucella ovis*  
cDNA= fita de DNA complementar  
Cys= cisteína  
DIGE= eletroforese diferencial em gel fluorescente  
DMEM= *Dulbecco Modified Eagle Medium*  
DPBS= tampão fosfato-salino Dulbecco  
Dpp= Transportador ABC para dipeptídeo  
DTT= ditionitrito  
EDTA= ácido etilenodiamino tetra-acético  
Gln= Glutamina  
HRP= peroxidase de *horseradish*  
IEF= focalizador isoelétrico  
IPG= imobilização de gradiente de pH  
Kan<sup>R</sup>= resistente à canamicina  
LAMP-1= proteína de membrana 1 associada ao lisossomo  
LPS= lipopolissacarídeo  
Met= metionina  
MOI= multiplicidade de infecção  
Nik= Transportador ABC para níquel  
OMP= proteína de membrana externa  
Opp= Transportador ABC para oligopeptídeo  
Pyro-Glu= Piroglutamato  
QS= proteína *quorum sensing*  
RER= retículo endoplasmático rugoso  
SDS-PAGE = eletroforese de gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio  
SFB= soro fetal bovino  
SST4= sistema de secreção tipo IV  
STm= *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium LT2  
Tet<sup>R</sup>= resistente à tetraciclina  
Tpp= Transportador ABC para tripeptídeo  
TSA= meio *Trypticase Soy Agar*  
TSB= meio *Trypticase Soy Broth*  
TTC= tetrazolium  
VCB= vacúolo contendo *Brucella*

## RESUMO

*Brucella ovis* é a principal causa de falha reprodutiva em carneiros e é uma das poucas espécies de *Brucella* spp. que não é zoonótica. Os objetivos deste trabalho foram realizar análise proteômica comparativa do mutante sem um transportador ABC espécie-específico funcional ( $\Delta abcAB$ ) com *B. ovis* selvagem (WT) e caracterizar seu tráfego intracelular, para elucidar o papel do sistema ABC na sua sobrevivência *in vitro* e intracelular. Na análise proteômica, foram identificados 55 *spots* de proteínas diferentemente expressas ( $p < 0,05$ ) entre WT e  $\Delta abcAB$ , sendo 22 proteínas com expressão diminuída no mutante  $\Delta abcAB$ , inclusive transportadores ABC de peptídeos e açúcares, proteínas de estresse metabólico e Omp31. Estes resultados evidenciam importantes funções do transportador ABC na patogênese e sobrevivência intracelular de *B. ovis*. Em células HeLa, *B. ovis* WT foi capaz de sobreviver e multiplicar em fase tardia de infecção, enquanto  $\Delta abcAB$  foi atenuada com 24 hpi. Na análise por confocal, a maioria de *Brucella* WT-mCherry escapou de compartimento LAMP-1<sup>+</sup> às 48 hpi, porém, quase 90% da  $\Delta abcAB$ -mCherry estava colocalizada com LAMP-1<sup>+</sup>. O  $\Delta abcAB$  apresentou fraca expressão do SST4 (VirB8 e VIRB11) em meio rico e meio ácido, quando comparado com amostra WT. Contudo, níveis de RNAm de *virB1*, *virB8*, *hutC* e *vjbR* foram similares em ambas as amostras. Estes resultados sugerem que transportador ABC é necessário para a expressão pós-transcricional do SST4 em *B. ovis* em fases tardias do tráfego intracelular.

**Palavras-chave:** *Brucella ovis*, SST4, fatores de patogenicidade, proteoma.

## ABSTRACT

*Brucella ovis* is a major cause of reproductive failure in rams and it is one of the few *Brucella* species that is not zoonotic. To verify how the ABC transporter plays a role during *B. ovis* *in vitro* and intracellular survival, the aims of this study were to compare proteomic profile and characterize intracellular trafficking of a mutant lacking a species-specific ABC transporter ( $\Delta abcAB$ ). Proteomic analyses identified 55 protein spots differently expressed ( $p < 0.05$ ) between WT and  $\Delta abcAB$  strains, whereas 22 proteins showed lower expression in  $\Delta abcAB$  strain, including aminoacid and sugar ABC transporters, metabolic stress proteins, and Omp31. These results may illustrate potential roles of ABC transporter in *B. ovis* pathogenesis and intracellular survival. In HeLa cells, *B. ovis* WT was able to survive and replicate at later time point, whereas  $\Delta abcAB$  was attenuated at 24 hpi. In confocal analyses, mCherry-WT *Brucella* was able to avoid the LAMP-1<sup>+</sup> compartment (~80%) at 48 hpi. However, almost 90% of mCherry- $\Delta abcAB$  colocalized with LAMP-1<sup>+</sup> compartment. Interestingly,  $\Delta abcAB$  mutant showed a weak expression of T4SS proteins (VirB8 and VirB11) in both rich and acid media, when compared to WT *B. ovis*. However, mRNA levels of *virB1*, *virB8*, *hutC*, and *yjbR* were similar in both strains. These results support the notion that ABC transporter is necessary for the expression of T4SS during late stages of *B. ovis* intracellular trafficking, although the transporter plays a role at a posttranscriptional level.

**Key words:** *Brucella ovis*, T4SS, pathogenic factors, proteome.

## 1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Brucella* que acomete animais domésticos e o homem, resultando em impacto socioeconômico significativo por sua ampla distribuição mundial e por ser uma das zoonoses bacterianas mais prevalentes em todo o mundo (Hartigan, 1997; Franco et al., 2007). Considerando as diferenças na patogenicidade, nas características bioquímicas e nos hospedeiros preferenciais, são reconhecidas mais de dez espécies pertencentes ao gênero *Brucella*, que incluem seis espécies clássicas (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*). Dentre elas, *Brucella ovis* é uma das poucas espécies de *Brucella* naturalmente rugosa e não patogênica para o homem (Godfroid et al., 2005), sendo a infecção natural restrita aos ovinos e a cervídeos em certas regiões geográficas (Ridler et al., 2000). A doença é caracterizada por epididimite, orquite e infertilidade nos machos e, ocasionalmente, está associada a aborto em fêmeas (Blasco, 1990).

*Brucella* spp. é um cocobacilo Gram negativo, intracelular facultativo, que possui capacidade de proliferar intracelularmente em células fagocíticas profissionais, como macrófagos, e em células não fagocíticas (Thoen et al., 1993). Este é um dos fatores determinantes para a sobrevivência e multiplicação do patógeno no hospedeiro. Diferentemente de outras bactérias patogênicas, fatores de virulência clássicos não são encontrados em *Brucella* spp. (Thoen et al., 1993; Gorvel e Moreno, 2002). Contudo, já foram identificados vários fatores de virulência que são determinantes para a sobrevivência intracelular de *Brucella* spp., tais como o sistema de secreção tipo IV (SST4) e transportadores ABC (Gorvel e Moreno, 2002; Silva et al., 2011).

O SST4 é um dos principais fatores de virulência para a sobrevivência e multiplicação intracelular de *Brucella* spp., uma vez que altera a maturação do vacúolo e inibe a sua fusão com o lisossomo. Vários estudos têm demonstrado o importante papel do operon *virB*, que codifica o SST4, para a sobrevivência e multiplicação intracelular de *Brucella* spp. (O'Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; den Hartigh et al., 2004). Mutantes *virB* de *B. abortus* não conseguem estabelecer infecção crônica em camundongos, apesar de apresentarem fenótipo semelhante ao WT até 5 dias pós infecção (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; Rolan e Tsolis, 2007). No entanto, a deleção polar de *virB2* em *B. ovis*, espécie naturalmente rugosa, resultou na atenuação do mutante desde o início da infecção, o que demonstra um fenótipo diferente das demais espécies clássicas de *Brucella* spp. (Sá et al., 2012).

Outro importante fator de virulência de *Brucella* spp. é o sistema transportador ABC. Transportadores ABC são responsáveis por importar íons e aminoácidos, exportar toxina, e a manutenção de expressão gênica (Tam e Saier, 1993; Ko e Splitter, 2000). Em *Brucella abortus*, foi demonstrado que o transporte ativo de polissacarídeo é importante para a patogenicidade da bactéria durante a infecção *in vivo* (Rosinha et al., 2002), enquanto sistemas ABC relacionados ao transporte de ferro e à excreção de toxinas não são necessários para a infecção crônica em camundongos (Ko e Splitter, 2000; Danese et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que uma proteína específica transportadora ABC (codificada por *abcA-E*) presente na ilha de patogenicidade 1 de *Brucella ovis* é essencial para a sua sobrevivência *in vivo* e para sua multiplicação *in vitro* em macrófagos no modelo murino (Silva et al. 2011). Contudo, não se sabe o papel específico desta proteína

transportadora e sua interferência em outros fatores de patogenicidade. Interessantemente, *B. ovis* codifica o menor número de transportadores ABC, uma vez que apresenta vários pseudogenes em regiões genômicas que codificam sistemas ABC em outras espécies de *Brucella*, relacionados à importação de nutrientes (Jenner et al., 2009).

O estudo de mecanismos exclusivos da *B. ovis* poderá elucidar a razão do baixo potencial zoonótico deste organismo quando comparado às espécies zoonóticas de *Brucella* (Tsolis et al., 2009). Além disso, o elevado número de pseudogenes de *B. ovis* (Jenner et al., 2009; Tsolis et al., 2009; Silva et al., 2011) permite avaliar o papel específico dos transportadores conservados em *Brucella* spp., através da deleção de um único gene. Isto possivelmente não seria viável em outras espécies, como *B. melitensis* e *B. abortus*, uma vez que esta possui uma variedade de transportadores, alguns redundantes, que podem compensar a função de um transportador ausente.

Assim, é de suma importância avaliar a função do transportador ABC específico de *B. ovis*, através de análises *in vitro* e proteômica do mutante *abcAB*, para compreender mecanismos patogênicos de *Brucella* spp. que são determinantes para a sua virulência. A análise proteômica comparativa entre amostras de *Brucella* spp. em cultivo laboratorial permite avaliar o que ocorre durante o tráfego intracelular. Contudo, em *B. ovis*, a escassez de estudos que caracterizam o seu perfil proteico limita a comparação da patogenicidade entre amostras mutantes desta espécie. Portanto, a utilização da análise proteômica tem grande potencial para evidenciar interações entre fatores de patogenicidade e suas interferências sobre o metabolismo e virulência de *B. ovis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O gênero *Brucella*

A brucelose é uma doença infecciosa amplamente distribuída no mundo e de grande impacto socioeconômico, uma vez que acomete animais domésticos e o homem (Franco et al., 2007). Esta doença tem sido considerada uma das principais zoonoses bacterianas com elevada prevalência em todo o mundo, com mais de 500.000 novos casos de infecção humana notificados anualmente, sendo a incidência humana muito variável, entre 0,03 a 1600 casos por um milhão de habitantes (Hartigan, 1997; Pappas et al., 2006). A brucelose humana ocorre principalmente em países em desenvolvimento do Mediterrâneo, Ásia Central, Península Arábica, Índia e América Latina (Franco et al., 2007; Seleem et al., 2010).

No interior da célula no hospedeiro, *Brucella* spp. 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 multiplicação 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, *Brucella* spp. causa alterações reprodutivas como aborto, nascimento de crias fracas e elevada mortalidade neonatal, orquite, epididimite e infertilidade, o que resulta em perdas produtivas importantes (Thoen et al., 1993; Poester et al., 2013), causando prejuízos econômicos extremamente significativos (Santos et al., 2013). No homem, a brucelose é caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, como febre recorrente, emagrecimento, depressão, meningite, endocardite, espondilite, artrite e, menos comumente, problemas reprodutivos

(Hartigan, 1997; Ko e Splitter, 2003; Franco et al., 2007).

O gênero *Brucella* pertence à família  $\alpha$ 2-Proteobacteriaceae, que é composta por uma diversidade de bactérias que variam desde espécies simbióticas até patógenos extracelulares de plantas, como *Agrobacterium tumefaciens*, ou intracelular obrigatório como *Rickettsia* sp. (Tsolis, 2002). Dentro desta família, *Ochrobactrum intermedium* apresenta 98,8% de similaridade do gene que codifica o RNA ribossomal, sendo considerada a espécie filogeneticamente mais próxima a *Brucella* spp. (Godfroid et al., 2011; Scholz et al., 2008b).

São reconhecidas seis espécies clássicas no 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). *B. melitensis* é a espécie com o maior potencial zoonótico, sendo que uma baixa dose do organismo via aerossol é capaz de estabelecer infecção crônica no homem. *B. abortus* e *B. suis* possuem médio potencial zoonótico, seguida de *B. canis*, que causa infecção mais branda no homem (Xavier et al. 2009). Além das seis espécies clássicas descritas, foram isoladas amostras de *Brucella* de mamíferos marinhos, que foram inicialmente classificadas com base nos hospedeiros marinhos, sendo identificadas como *B. pinnipedialis* e *B. ceti*, as amostras isoladas de focas e cetáceos, respectivamente (Foster et al., 2007). Contudo, outros estudos 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).

Adicionalmente, foram identificadas três novas espécies de *Brucella*: *B. microti* descrita em roedores (Scholz et al., 2008a), *B. inopinata* (linhagem BO1) isolada de implante mamário em uma mulher (De et al., 2008; Scholz et al., 2010), 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). Recentemente, foi isolado uma nova espécie de *Brucella* sp. em sapo africano (*Pyxicephalus edulis*), com 100% de identidade com RNA ribossomal 16S de *B. inopinata*, apesar de o perfil bioquímico ser similar ao de *Ochrobactrum* sp. (Eisenberg et al., 2012).

Apesar da possibilidade de diferenciar as espécies de *Brucella* através de testes bioquímicos e fenotípicos, a hibridização de DNA demonstrou que o genoma de *Brucella* spp. apresenta similaridade genética maior que 90% entre os membros do gênero (Vergier et al., 1998, Moreno et al., 2002). Este dado gerou controvérsias quanto à taxonomia do gênero *Brucella*, ao dar suporte à prévia proposição de que todas as amostras seriam biovares da mono-espécie *B. melitensis* (Vergier 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., 2007), favorecendo que a atual classificação taxonômica seja mantida (Moreno et al., 2002; Xavier et al., 2009).

## 2.2. Infecção por *Brucella ovis*

*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 *Trueperella (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).

*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). O mesmo agente foi isolado na Austrália tanto em carneiros naturalmente infectados (Simmons e Hall, 1953) como em carneiros experimentalmente infectados (Buddle e Boyes, 1953), além de ter sido isolado nos 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; Silva 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 inquérito epidemiológico de *B. ovis* na Paraíba demonstrou que 8,59% das propriedades apresentaram soroconversão e 5,57% dos reprodutores são soro reativos (Clementino et al., 2007). No Piauí, 12,9% dos rebanhos avaliados apresentaram carneiros positivos para PCR ou sorologia (Costa et al., 2012). 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, *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 (Alton et al., 1988). Para o crescimento adequado de *B. ovis*, é necessária a adição de 5% de soro ou sangue ao meio de cultura. O microrganismo é pequeno, imóvel, não apresenta cápsula, não forma endosporos e cresce em meio sólido após 5 a 7 dias de incubação a 37°C em atmosfera com 5 a 10% de CO<sub>2</sub> (Alton et al., 1988). As colônias apresentam coloração acinzentada, morfologia circular com aproximadamente 2 mm de diâmetro, superfície brilhante e convexa (Burguess, 1982). Nas provas bioquímicas, *B. ovis* é catalase positiva, oxidase negativa, não possui atividade de urease, não reduz nitrito a nitrato e nem produz H<sub>2</sub>S. 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, 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, no entanto, foi 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).

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, sendo observado células inflamatórias no ejaculado desde 30 dias pós infecção (Carvalho Junior et al., 2012). Além disso, a eliminação de *B. ovis* no sêmen e na urina de carneiros experimentalmente infectados foram confirmadas por cultivo bacteriológico a partir de 45 dias e 30 dias pós infecção, respectivamente (Xavier et al., 2010). Ainda não são conhecidos os fatores que determinam o tropismo de *B. ovis* pelo trato genital, porém, sabe-se que não está relacionado ao eritról (Redwood e Corbel, 1983), uma vez que *B. ovis* possivelmente não seja capaz de metabolizar este açúcar (Tsolis et al., 2009, Al Dahouk et al., 2010).

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 vesícula seminal. Em infecção experimental de carneiros, observa-se intenso infiltrado local composto predominantemente por

neutrófilos. Posteriormente, o infiltrado se estende para o tecido conjuntivo e epitélio do epidídimo e há acúmulo acentuado de infiltrado neutrofílico no ducto epididimário (Searson, 1987; Santos et al., 2005). As lesões iniciais progredem para fibrose intersticial e degeneração epididimária com formação de cistos intra-epiteliais, o que pode levar à ruptura do ducto epididimário, extravasamento de espermatozoides para o interstício e à formação de granuloma espermático. Devido à extensão do processo inflamatório, o carneiro também apresenta discreta a moderada degeneração testicular uni ou bilateral. Isto resulta em perda da qualidade espermática, com aumento de defeitos espermáticos e diminuição da concentração espermática, levando o animal ao quadro de subfertilidade (Carvalho Junior et al., 2012).

Em casos de infecção crônica, o carneiro apresenta aumento, frequentemente unilateral, do volume da cauda do epidídimo, que possui consistência firme e coloração esbranquiçada ao corte, devido à proliferação de tecido conjuntivo fibroso (Blasco, 1990). Na microscopia, o epidídimo apresenta acentuada fibrose e infiltrado linfo-plasmocitário intersticial associado à hiperplasia epitelial do ducto epididimário. As vesículas seminais podem apresentar aumento de volume com ductos preenchidos por líquido e, na histologia, apresentam infiltrado linfo-plasmo-histiocitário intersticial difuso, além de acúmulo de infiltrado neutrofílico intraluminal. As glândulas bulbo-uretrais, próstata e ampolas seminais geralmente não apresentam alterações significativas (Foster, 1987; Santos et al., 2005; Carvalho Junior et al., 2012).

### **2.3. Análise genômica de *Brucella ovis***

O genoma de *Brucella* spp. é constituído por dois cromossomos circulares sem plasmídeo e com elevada identidade genética entre as diferentes espécies do gênero. 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 multiplicação estão presentes no cromossomo II (Paulsen et al., 2002). As espécies clássicas de *Brucella* possuem valores muito similares de porcentagem G+C (~57,2%), do número de genes por genoma (~3460 genes) e de genes que codificam proteínas (~3180 genes) (Tsolis et al., 2009; Wattan et al., 2009).

A amostra de referência *B. ovis* ATCC 25840 (também conhecida como 63/290 ou NCTC 10512), 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 clássicas de *Brucella* previamente sequenciadas, incluindo *B. melitensis* (DelVecchio et al., 2002), *B. suis* (Paulsen et al., 2002) e as amostras 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 de *Brucella* spp. estão ausentes na *B. ovis*. Isto se deve à deleção de regiões genômicas ou à presença de potenciais pseudogenes (Tsolis et al., 2009). *B. ovis* possui o maior número de pseudogenes preditos (Wattan et al., 2009), que representam aproximadamente 11% dos genes que constituem o cromossomo II (Tsolis et al., 2009). Possivelmente, o acúmulo de pseudogenes em regiões de *Brucella* spp. com funções regulatórias contribuíram para o baixo nível de

patogenicidade de *B. ovis* e sua restrição de hospedeiro. Determinadas características bioquímicas que conferem menor virulência à *B. ovis* estão evidenciadas no genoma, por exemplo, 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 apresentar mutação nos genes *eryA* e *eryD*, responsáveis por sua oxidação; e o fenótipo de urease negativa, devido à deleção e mutação pontual no operon *ureCI* (Tsolis et al., 2009). Contudo, outras regiões associadas a fatores de virulência estão conservadas no genoma, como o operon *virB* (*virB1-virB12*) com SST4 funcional, o sistema regulatório BvrR:BvrS,  $\beta$ -glucan cíclico, algumas proteínas transportadoras, entre outras (Tsolis et al., 2009).

O sequenciamento de *B. ovis* resultou na identificação de uma ilha genômica de 26,5 Kb presente no cromossomo II constituída por 28 ORFs que estão ausentes nas demais espécies clássicas de *Brucella* (Tsolis et al., 2009). Com base no papel deste segmento na patogênese de *B. ovis*, o mesmo foi denominado ilha de patogenicidade I de *B. ovis* (BOPI-1) (Silva et al., 2011). A mesma ilha genômica foi identificada em três amostras de *B. ceti* isoladas de golfinhos nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*). Nas análises de PCR de 12 ORFs, foi confirmado que estas sequências alvo estão ausentes em *Ochrobactrum intermedium* e *Ochrobactrum anthropi*, que são bactérias filogeneticamente próximas à *Brucella* spp. (Tsolis et al., 2009; Xavier et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado o potencial patogênico de proteínas específicas de *B. ovis* codificadas nesta ilha genômica, como o transportador ABC codificado pelo locus *abcA-E*. A deleção parcial deste locus resultou em um mutante atenuado, que não é capaz de sobreviver *in vivo* ou em linhagem celular de macrófago murino. No entanto, o

gene *hmg* de BOPI-1, que possivelmente codifica uma hemaglutinina, não foi necessário para a sobrevivência *in vivo* de *B. ovis* (Silva et al., 2011).

#### 2.4. Fatores de patogenicidade de *Brucella* spp. e seus reguladores

Os fatores de virulência estão envolvidos na patogenicidade da bactéria, uma vez que determinam a capacidade de invasão, multiplicação e sobrevivência intracelular no hospedeiro. Fatores de virulência clássicos presentes em bactérias patogênicas, tais como fímbrias, flagelo, e cápsula, não são encontrados em *Brucella* spp. (Gorvel e Moreno, 2002). No entanto, há descrição de inúmeros fatores de virulência que são determinantes para a invasão e multiplicação intracelular de *Brucella* spp., incluindo o sistema de secreção tipo IV, sistema transportador ABC, lipopolissacarídeo, proteínas de membrana externa e sistema de dois componentes BvrR/BvrS (O'Callaghan et al., 1999; Cloeckert et al., 2002; López-Goñi et al., 2002; Lapaque et al., 2005; Silva et al., 2011).

##### 2.4.1. Sistema Secreção Tipo IV (SST4)

Um dos principais fatores de virulência para a sobrevivência e multiplicação intracelular de *Brucella* spp. é o 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 meio extracelular (O'Callaghan et al., 1999; Boschioli et al., 2002). Com o estudo da conformação estrutural do sistema VirB em *Agrobacterium tumefaciens*, foram identificados três grupos funcionais: o pílus

na superfície bacteriana (VirB2 e VirB5), um canal proteico transmembrana (VirB3 e 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). Duas proteínas efetoras, VceA e VceC, foram descritas como sendo dependentes de VirB para serem translocadas para a célula do hospedeiro. Apesar de ambos os genes *vceA* e *vceC* serem conservados em *Brucella* spp. (de Jong et al., 2008; Tsolis et al., 2009), não foi identificada a expressão destas proteínas em *B. ovis* durante o crescimento *in vitro* (de Jong, 2012). Outro estudo identificou quatro novas proteínas efetoras putativas translocadas via SST4 em *B. abortus*, que possuem domínios similares às células eucariotas, o que sugere uma interação destas proteínas com células do hospedeiro infectado (Marchesini et al., 2011).

O SST4 é essencial para o estabelecimento de infecção persistente, pois interfere diretamente no vacúolo contendo *Brucella* spp. e inibe a fusão fagolisossomal, permitindo que o patógeno 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 multiplicação intracelular das espécies clássicas de *Brucella*, uma vez que vários mutantes gerados através de deleção polar ou apolar de *virB* foram atenuadas, ao perderem a capacidade de multiplicar 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).

Com exceção dos genes *virB7* e *virB12*, os quais não são essenciais para o SST4 funcional em *Brucella* spp. (Sun et al., 2005; den Hartigh et al., 2008), mutantes *virB* de *Brucella* spp. são incapazes de estabelecer infecção persistente em modelo murino, sendo esta controlada até 15 dias após inoculação intraperitoneal (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; den Hartigh et al., 2008). No entanto, em *B. ovis*, a atenuação de mutante *virB* é evidenciada desde a fase aguda da infecção no modelo murino (Sá et al., 2012).

Há inúmeros sinais que regulam a expressão do operon *virB*, tais como a acidez do ambiente, restrição nutricional e densidade da população. Sabe-se que proteínas *virB* são induzidas em fase exponencial tardia durante crescimento *in vitro* (Sieira et al., 2000; Boschioli et al., 2002; Rouot et al., 2003), apesar de haver diferença na expressão entre as espécies de *Brucella*. Enquanto *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. ovis* expressam proteínas *VirB* durante crescimento em meio rico líquido de tripticase de soja (TSB), *B. suis* não é capaz de expressar. Além disso, foi demonstrado que a expressão de *virB* é induzida nas amostras patogênicas e em amostras vacinais de *Brucella* quando cultivadas em meio mínimo ácido (Rouot et al., 2003), o que mimetiza o pH inicial do vacúolo contendo *Brucella* (VCB) após a internalização celular da bactéria (Porte et al., 1999). No meio intracelular, a acidez e restrição nutricional na fase inicial favorecem a máxima expressão do SST4 em *Brucella* spp. com 5 horas pós infecção (Boschioli et al., 2002; Sieira et al., 2004), seguida de inibição na expressão de *virB* antes de iniciar a fase de multiplicação intracelular (Sieira et al., 2004). Em *B. suis*, a expressão constitutiva de SST4 durante a infecção comprometeu a multiplicação intracelular em comparação à amostra selvagem (O'Callaghan et al., 1999).

As proteínas reguladoras respondem aos sinais do ambiente e coordenam a expressão do SST4 durante a infecção. Duas proteínas reguladoras descritas a seguir, denominadas fator de integração do hospedeiro (IHF) e proteína reguladora de utilização de histidina (HutC), evidenciaram a interação entre a restrição nutricional e a indução de SST4 em *Brucella* spp. (Sieira et al., 2004; Sieira et al., 2010; Sieira, 2013).

A proteína reguladora IHF foi a primeira descrita a se ligar diretamente ao promotor *virB*, levando a alteração conformacional da região, o que potencialmente favorece a ligação de outros reguladores e a transcrição do locus *virB* (Sieira et al., 2004). O IHF é importante para a transcrição *in vitro* de proteínas do SST4 em meio mínimo neutro, porém, em meio ácido, a expressão é independente de IHF. Isto sugere que esta proteína atue como sensor secundário à restrição nutricional durante a infecção celular (Sieira et al., 2004; Tsolis e O'Callaghan, 2012). Contudo, IHF é essencial para o tráfego intracelular normal de *Brucella* spp., uma vez que, na ausência do sítio de ligação para IHF, a bactéria não é capaz de sobreviver intracelularmente (Sieira et al., 2004).

A proteína HutC atua como repressor dos genes *hut*, que codificam a via catabólica de utilização da histidina como fonte de carbono (Bender, 2012). Em *Brucella* spp., a presença de HutC induz a expressão do SST4 ao se ligar diretamente ao promotor do operon *virB*, enquanto inibe a via metabólica dos genes *hut* (Sieira et al., 2010, Sieira, 2013). A expressão de proteínas *VirB* é dependente de HutC em meio com restrição nutricional e baixo pH, porém, não em meio neutro. Isto sugere que o SST4 seja co-regulado por ambas as proteínas HutC e IHF, que sinalizam em pH distintos durante o tráfego intracelular (Sieira et al., 2010; Arocena et al., 2012). Adicionalmente, a transcrição *in vitro* de *virB* pode ser induzida pela adição de ácido urocânico ao meio. O

ácido urocânico é o primeiro produto intermediário da via catabólica de histidina, no qual *Brucella* spp. é capaz de metabolizar, resultando no aumento da expressão das proteínas reguladoras HutC e VjbR (Dorell et al., 1999; Arocena et al., 2012; Sieira, 2013).

Proteínas sensoras denominadas *quorum sensing* (QS) constituem um sistema regulatório que controla a expressão gênica de acordo com a densidade da população bacteriana local (Miller e Bassler, 2001). Em *Brucella* spp., foram descritas duas proteínas da família de reguladores LuxR que modulam a expressão do SST4: as proteínas VjbR e BabR (Delrue et al., 2005; Weeks et al., 2010). VjbR é um dos principais fatores de transcrição de SST4 e, como descrito para HutC e IHF, se liga diretamente à região promotora do *virB* (Delrue et al., 2005; de Jong et al., 2008; Arocena et al., 2010). O sítio de ligação de VjbR é o mais próximo ao sítio iniciador de transcrição de *virB*, quando comparado as outras proteínas reguladoras (Tsolis e O'Callaghan, 2012; Sieira, 2013). Durante crescimento *in vitro*, a expressão de VjbR é induzida por três principais fatores: a restrição nutricional, o baixo pH (~5,5) e elevada concentração de ácido urocânico (de Jong et al., 2008; Arocena et al., 2012). Foi demonstrado que a indução *in vitro* de VjbR via ácido urocânico é a nível pós-transcricional, ou seja, durante a tradução proteica. A expressão das proteínas VjbR e VirB7 foram maiores em meio com ácido urocânico do que no meio controle, apesar da ativação dos promotores de *vjbR* e *virB*, avaliada por atividade de  $\beta$ -galactosidase, ter sido similar em ambos os meios. Isto confere a *Brucella* spp. a habilidade de expressar uma proteína regulatória sem a ativação direta do promotor *vjbR* (Arocena et al., 2012). A regulação via VjbR é essencial para a sobrevivência intracelular de *Brucella* spp., uma vez que a amostra mutante para *vjbR* é atenuada em cultivo celular e no modelo animal, o que se assemelha ao fenótipo

observado nos mutantes *virB* (Delrue et al., 2005).

Outra proteína sensora que regula o SST4 em *Brucella* spp. foi denominada BabR ou BlxR. Inicialmente, BabR foi descrito em *B. melitensis* como regulador positivo da transcrição de *virB* e de flagelo (Rambow-Larsen et al., 2008). Contudo, novos estudos demonstraram que BabR modula a ação de VjbR, reprimindo a expressão do SST4 (Uzureau et al., 2010; Weeks et al., 2010). A deleção da proteína BabR, diferentemente de VjbR, não resulta em atenuação de *Brucella* spp. Adicionalmente, há indícios que a presença intracelular da molécula sinalizadora lactona homoserina (C<sub>12</sub>-HSL), apesar de se ligar às proteínas sensoras BabR e VjbR, esta ativa a expressão de BabR, enquanto inibe a ação de VjbR sobre o SST4 (Uzureau et al., 2010; Weeks et al., 2010; Tsolis e O'Callaghan, 2012).

O sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS também regula os genes *virB* em *Brucella* spp. Apesar de não ter sido descrito o mecanismo exato de interação entre BvrR/BvrS e o SST4, foi demonstrado que este sistema regulatório interfere na expressão de *vjbR* e é capaz de se ligar diretamente à região promotora de *virB* (Martínez-Núñez et al., 2010). A função de BvrR/BvrS como fator de virulência em *Brucella* spp. será discutido posteriormente.

#### 2.4.2. Sistema transportador ABC

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; Silva et al., 2011). 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). 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; Higgins, 2001). Tanto em eucariotos como em procariotos, o sistema ABC possui estrutura conservada, constituída por duas proteínas de membrana (permease) com seis segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélices e duas proteínas intracitoplasmáticas responsáveis pela ligação e hidrólise de ATP (ATPase). A sequência que codifica as proteínas ATPases apresenta três domínios altamente conservados em todos os sistemas ABC, denominados *Walker A*, *Walker B* e *loop C* (constituído pelos aminoácidos LSGGQ) (Tam e Saier, 1993; Higgins, 2001; van der Does e Tampé, 2004). Os transportadores ABC são predominantemente exportadores, porém, somente em procariotos, podem atuar como importadores de nutrientes na presença de proteínas periplasmáticas, denominada proteína ligadora ao substrato (PLS), que se ligam com alta afinidade a um grupo específico de substrato (van der Heide e Poolman, 2002). Em bactérias Gram negativas, a elevada concentração de PLSs no periplasma sugere que, além de participarem do sistema ABC, também atuem no dobramento de proteínas e na resposta bacteriana ao estresse, com função similar às proteínas chaperonas (Richarme e Caldas, 1997).

No gênero *Brucella*, foi demonstrado que um gene específico envolvido no transporte de polissacarídeo é importante para a patogenicidade do organismo na infecção de 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 transportadores ABC de *B. abortus* que não são necessários para a sobrevivência intracelular e o estabelecimento de infecção crônica *in vivo*,

apesar de terem funções importantes, como o transporte de ferro (Danese et al., 2004) e a excreção de toxinas (Ko e Splitter, 2000). Porém, em *B. ovis*, a deleção de um transportador ABC específico putativo resultou em sua completa atenuação *in vivo* em camundongos e *in vitro* em macrófagos (Silva et al., 2011). Embora o transportador ABC em *B. ovis* aparentemente seja importante para a sua virulência no modelo murino, ainda não se sabe qual a sua função transportadora, nem qual molécula é transportada.

Um estudo das regiões genômicas que codificam transportadores ABC 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). Foi demonstrado que aproximadamente 8,8% do genoma de *Brucella* spp. é constituído por genes que codificam transportadores ABC 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, *B. ovis* codifica o menor número de proteínas transportadoras, com 29 pseudogenes no sistema ABC relacionado à importação de nutrientes, sendo esta espécie incapaz de importar 8 de 26 nutrientes que sabidamente são transportados por este sistema no gênero *Brucella* (Jenner et al., 2009).

#### 2.4.3. Outros fatores de patogenicidade

O LPS é um importante componente da membrana externa de bactérias Gram negativo, sendo constituído por lipoproteína A, um núcleo 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 fagolisossomo e a apoptose de macrófagos, favorecendo a sobrevivência e multiplicação intracelular de *Brucella* spp. no hospedeiro (Lapaque et al., 2005). Além da cadeia O, um estudo recente demonstrou que o núcleo de oligossacarídeo também interfere no reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro. Neste estudo, a deleção em *B. abortus* do gene de glicosiltransferase (*wadC*) relacionado à síntese do núcleo, resultou na deposição de complemento e ativação da resposta inata via TLR4, apesar do mutante apresentar lipídio A e cadeia O do LPS íntegros (Conde-Álvarez et al., 2012).

Proteínas de membrana externa (OMP), que compõem a membrana externa de *Brucella* spp., possuem importante papel na invasão celular e potencial imunogênico (Vizcaíno et al., 1996; Rossetti et al., 2009). As principais OMP descritas em *Brucella* spp. são Omp31, Omp25 e Omp2b, sendo estas expostas na superfície da bactéria e intimamente associadas ao peptidoglicano da parede celular (Clockaert et al., 1992; Vizcaíno et al., 1996). A elevada expressão de OMP foi observada durante a fase logarítmica de crescimento de *Brucella* spp., o que foi associada a sua maior invasibilidade em células epiteliais (Rossetti et al., 2009). Em amostras lisas de *Brucella* spp., as OMP são menos expostas aos anticorpos do que em amostras rugosas, devido a longa cadeia O do LPS (Bowden et al., 1995). Em *B. ovis*, foi demonstrado que

a deleção de *omp25* e *omp31* não interfere na multiplicação intracelular em macrófagos ou célula epitelial HeLa, enquanto a ausência de *omp22* resulta em completa atenuação do patógeno (Martín-Martín et al., 2008). Apesar da tentativa de utilizar OMP como vacina de DNA e em diagnóstico sorológico para infecções por *Brucella* spp. lisas, o uso desta proteína tem sido mais eficiente em amostras rugosas, como *B. ovis* (Bowden et al., 1995; Clockaert et al., 2002).

O sistema regulatório de dois componentes BvrR:BvrS de *Brucella* spp. regula a expressão de genes que codificam LPS e OMP, que estão relacionados à invasão celular. 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 *A. tumefaciens* (Sola-Landa et al., 1998; 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, mutantes para BvrR/BvrS não conseguem escapar da fusão fago-lisossomo e são susceptíveis a peptídeos antimicrobianos e ao complemento (Guzmán-Verri et al., 2002; López-Goñi et al., 2002; Manterola et al., 2005).

## 2.5. Tráfego intracelular de *Brucella* spp.

*Brucella* spp. é um patógeno intracelular capaz de sobreviver e multiplicar em células fagocíticas profissionais, não profissionais e em células não fagocíticas. *Brucella* spp. é capaz de multiplicar *in vitro* em linhagem celular epitelial e de macrófagos, além de infectar cultivo primário de trofoblastos, macrófagos de hospedeiros naturais e macrófagos humanos (Celli et al., 2003; Maquart et al., 2009; Silva et al., 2011;

Macedo et al., 2013; Salcedo et al., 2013). Dentre as células não fagocíticas, a linhagem de célula epitelial HeLa tem sido frequentemente utilizada para estudar multiplicação e tráfego intracelular de *Brucella* spp. (de Jong et al., 2008; Starr et al., 2008; Starr et al., 2012).

Durante a infecção *in vitro*, somente uma pequena quantidade de *Brucella* spp. é capaz de aderir à superfície das células fagocíticas e não fagocíticas, quando comparado a outros patógenos intracelulares do filo Proteobacteria, tais como *Salmonella*, *Shigella* e *Legionella* (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 1998b; Sola-Landa et al., 1998). Porém, aquelas bactérias capazes de aderirem às células possuem elevada capacidade de internalização (Moreno e Moriyón, 2006). Adicionalmente, mutante de *Brucella* spp. com o sistema BvrR/BvrS afuncional apresenta deficiente internalização celular (Sola-Landa et al., 1998; Guzmán-Verri et al., 2001), enquanto amostras naturalmente rugosas (como *B. ovis*) e mutantes rugosos aderem e internalizam mais do que amostras clássicas lisas (Detilleux et al., 1990; Rittig et al., 2003; Sá et al., 2012).

A internalização de *Brucella* spp. possui características distintas entre células fagocíticas profissionais (como macrófagos) e não fagocíticas (como células epiteliais HeLa, Vero e fibroblastos). Contudo, alguns eventos ocorridos durante o tráfego intracelular são similares em ambas as células (Pizarro-Cerdá et al., 2000; Gorvel e Moreno, 2002). Em macrófagos, a internalização de *Brucella* spp. lisa não opsonizada ocorre através da interação da cadeia O do LPS com subdomínios da membrana plasmática ricos em colesterol, denominado plataformas lipídicas (Moreno e Moriyón, 2006; Roop et al., 2009). Mutantes rugosos de *Brucella* spp. não são capazes de interagir com plataformas lipídicas e são imediatamente fagocitados após ativação de TLR4 ou receptores de manose (Porte et al.,

2003). Contudo, não há evidências que amostras patogênicas naturalmente rugosas, como *B. ovis* e *B. canis*, são internalizadas por esta mesma via (Covert et al., 2009), sendo sugerido que ambas as amostras são dependentes de componentes de plataformas lipídicas para internalizar em macrófagos (Martín-Martín et al., 2010). Em célula epitelial HeLa, a internalização de *Brucella* spp. ocorre através de desestruturação da membrana, que está associada ao recrutamento de filamentos de actina para o sítio de ligação e à ativação de pequenas moléculas de GTPases, como Cdc42, Rac e Rho (Guzmán-Verri et al., 2001; Gorvel e Moreno, 2002; Moreno e Moriyón, 2006).

Logo após a internalização (5 a 10 min), tanto em macrófago como em células HeLa, a bactéria é envolta por uma membrana, sendo o compartimento denominado vacúolo contendo *Brucella* (VCB). Os VCB rapidamente adquirem marcadores iniciais de endossomo, como Rab5 (pequena molécula ligadora à GTP) e EEA-1 (antígeno de endossomo inicial) (Pizarro-Cerdá et al., 2000; Celli, 2006), os quais são temporários. Em seguida, os VCB interagem transitoriamente com lisossomos, o que resulta em sua acidificação e maturação, que são essenciais para a ativação de fatores de patogenicidade, como o SST4 (Porte et al., 1999; Celli et al., 2003). A fusão lisossomal temporária resulta na marcação positiva de VCB para LAMP-1 (proteína de membrana associado ao lisossomo) e na formação de compartimento com múltiplas membranas, o que sugere ser um fagolisossomo (Pizarro-Cerdá et al., 1998b; Moreno e Moriyón, 2006; Starr et al., 2012). Em seguida, após 12 a 24 horas da internalização, os VCB escapam do lisossomo e se fundem às membranas com marcadores similares ao retículo endoplasmático rugoso (RER), atingindo o nicho ideal para a multiplicação intracelular do patógeno (Pizarro-Cerdá et al., 2000; Celli et al., 2003; Starr et al., 2008). Nesta fase de multiplicação, o compartimento contendo *Brucella* spp. perde

os marcadores lisossomais e se torna positivo para marcadores específicos de RER, tais como calreticulina, calnexina e  $\text{sec61}\beta$  (proteína translocadora de membrana, subunidade beta). Outros marcadores de RER, como a proteína de membrana ribosômica e proteína citoplasmática BiP/GRP78 (proteína ligadora à imunoglobulina) não foram descritas em VCB (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Celli et al., 2003; Moreno e Moriyón, 2006).

Em células HeLa, a maioria de *Brucella* spp. internalizada é desviada para o compartimento similar ao RER, enquanto poucas bactérias sofrem fusão fagolisossomal e são destruídas. Contudo, em macrófagos, a maioria dos VCB é direcionado para a fusão com lisossomo, enquanto menor número de *Brucella* spp. é capaz de sobreviver e atingir o nicho de multiplicação. Isto evidencia que linhagens epiteliais não possuem propriedades bactericidas como macrófagos (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Celli et al., 2003; Starr et al., 2008), o que permite avaliar o tráfego intracelular de amostras de *Brucella* spp. que são atenuadas em macrófagos. Outro aspecto que deve ser considerado durante a infecção *in vitro* de linhagens epiteliais é que a percentagem de células infectadas e o número inicial de bactérias por célula são frequentemente baixos (Dettloux et al., 1990; Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 1998b). Mesmo elevando o inóculo bacteriano, o nível de infecção por célula não é aumentado, o que sugere que nem todas as células cultivadas são susceptíveis à infecção e multiplicação de *Brucella* spp. (Sola-Landa et al., 1998).

## 2.6. Análise proteômica do gênero *Brucella*

A patogênese da brucelose é dependente da habilidade da bactéria de invadir e multiplicar no retículo endoplasmático em células epiteliais especializadas presentes na

mucosa (como células M) e em fagócitos (Gorvel e Moreno, 2002). Considerando esta afirmativa, a utilização de técnicas biomoleculares, tais como as análises transcriptômica e proteômica, têm contribuído para dissecar aspectos peculiares do ciclo de vida e patogênese de *Brucella* spp., além de compreender a variação de fenótipo entre diferentes espécies (Chaves-Olarte et al., 2012). Contudo, os resultados obtidos com análise transcriptômica não necessariamente correspondem aos de proteômica. Isto se deve às modificações pós-transcricionais (como *splicing*), modificações pós-traducionais (como glicosilação, fosforilação e metilação) e à tradução de diferentes produtos proteicos a partir de um gene, os quais impedem uma correlação direta entre o RNA mensageiro e a proteína sintetizada (Tanto e Henry, 2006; Viadas et al., 2010). Desta forma, a proteômica favorece o estudo de propriedades metabólicas, estruturais e de fatores de patogenicidade que estão diretamente relacionados ao fenótipo da bactéria (Chaves-Olarte et al., 2012).

Para a análise proteômica, primeiramente, a boa qualidade de extração e fracionamento da amostra são essenciais para obter um resultado acurado com menor variabilidade e maior reprodutibilidade. Ao avaliar as proteínas em *spots* detectados em géis de amostras proteicas de *Brucella* spp., deve-se considerar que sua parede confere resistência a diversos detergentes e que proteínas de membrana não são eficientemente extraídas por métodos convencionais (Moriyón e López-Goñi, 1998). Além disso, pode haver variações interespecies, como a separação de *spots* entre amostras lisas e rugosas, uma vez que o LPS rugoso migra para a base do gel e causa menor agregação e distorção do padrão proteico (Gamazo et al., 1989).

O gel de eletroforese SDS-PAGE bidimensional (2D) é um método de fracionamento amplamente utilizado, que

permite visualizar proteínas com modificações pós-traducionais, apesar de ser limitante na avaliação de proteínas de membrana. Outras limitações do gel 2D incluem a reduzido número de amostras, a baixa resolução para proteínas hidrofóbicas (como proteínas transmembrana), e maior risco de variabilidade entre géis devido à elevada intervenção manual (Chaves-Olarte et al., 2012). Um aprimoramento do gel 2D foi a eletroforese diferencial em gel 2D (DIGE), na qual utiliza corantes fluorescentes para marcar grupos lisina das proteínas antes da focalização isoeétrica (Wu et al., 2006). Essa técnica permitiu marcar um maior número de amostras com diferentes corantes em um único gel, aumentando a sensibilidade, além de reduzir a variabilidade entre os padrões de *spots* e o número de géis necessários por experimento. Outra vantagem do DIGE sobre o gel 2D é a elevada reprodutibilidade com a inclusão de uma amostra padrão em cada gel, sendo utilizada como normalizador das medidas de abundância de proteínas entre diferentes géis de um mesmo experimento (Wu et al., 2006).

Associado ao gel 2D e DIGE, a espectrometria de massa (MS) tem sido uma importante ferramenta para análise proteômica, uma vez que é capaz de identificar proteínas e peptídeos com rapidez, elevada especificidade e sensibilidade. O desenvolvimento das técnicas avançadas de ionização de MS, como o *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI/MS), associada ao sequenciamento genômico de *Brucella* spp. (Delvecchio et al., 2002, Paulsen et al., 2002; Chain et al., 2005), foram definitivos para favorecer o estudo proteômico na área de brucelose (Guzman-Verri et al., 2002; Delpino et al., 2009; Wang et al., 2009; Uruzeau et al., 2010).

Um dos estudos pioneiros utilizando gel 2D para *Brucella* spp. comparou a expressão proteica entre *B. abortus* 2308 e amostras

vacinais atenuadas lisa e rugosa, que foram cultivadas em laboratório (Sowa et al., 1992). A identificação de 28 *spots* diferentes entre amostras lisas e rugosas foram associadas à síntese de LPS, sendo esta a primeira evidência de que a variação proteômica está relacionada às diferenças metabólicas existentes entre espécies com alta e baixa virulência (Sowa et al., 1992). Em seguida, um estudo proteômico de *B. abortus* evidenciou que a variação do perfil proteico era dependente das condições de crescimento intracelular, tais como estresse oxidativo, estresse nutricional e baixo pH (Lin e Fitch, 1995). Outro estudo caracterizou, pela primeira vez, o perfil de proteínas expressas por *B. ovis* durante cultivo *in vitro* em laboratório, sendo esta comparada com a amostra *B. melitensis* (Teixeira-Gomes et al., 1997). Contudo, devido à limitação de técnicas nesta época, menos de 30% dos *spots* que apresentaram diferença na expressão foram identificadas por *Western blot* ou microsequenciamento N-terminal de proteínas. Adicionalmente, este trabalho permitiu identificar proteínas com potencial imunogênico, que foram imunomarcadas com soro de carneiros naturalmente infectados, tais como proteína de membrana (BP26), chaperonas (DnaK e GroEL) e transportador de níquel NikA (Teixeira-Gomes et al., 1997).

O primeiro estudo proteômico utilizando técnica avançada de MALDI/MS avaliou a diferença entre *B. melitensis* e amostra vacinal atenuada Rev.1, o que resultou na identificação de 15 proteínas diferentemente expressas, que evidenciaram alterações metabólicas entre as duas amostras (Wagner et al., 2002). Posteriormente, o perfil de proteínas em *B. melitensis* 16M e *B. abortus* 2308 foram avaliados na fase estacionária tardia de crescimento *in vitro* (Eschenbrenner et al., 2006). Das 45 proteínas diferentemente expressas entre as amostras, a maioria correspondeu a proteínas citoplasmáticas e periplasmáticas, não sendo evidenciada a diferença esperada

entre proteínas de membrana externa (OMP). Além disso, as diferenças entre as duas espécies distintas de *Brucella* spp. foram atribuídas às proteínas envolvidas no transporte de membrana e em sistemas de secreção (Eschenbrenner et al., 2006).

Importante fatores de patogenicidade de *Brucella* spp., como proteínas virB do SST4, dois componentes BvrR/BvrS e fatores de regulação VjbR e BabR, também foram caracterizados através de análise proteômica (Delpino et al., 2009; Wang et al., 2009; Uzureau et al., 2010; Wang et al., 2010).

Wang e colaboradores (2009) analisaram perfil proteico de *B. melitensis* e do mutante sem o promotor *virB* (*p<sub>virB</sub>*) durante o crescimento *in vitro* em condição experimental que induz a expressão do SST4. Neste estudo, foram identificadas 44 proteínas com diminuição e 18 com aumento da expressão no mutante *p<sub>virB</sub>*, dentre elas proteínas envolvidas no transporte e metabolismo de aminoácidos, metabolismo lipídico, produção de energia, modificações pós-traducionais e na síntese de membrana. Proteínas associadas à adaptação e sobrevivência intracelular apresentaram reduzida expressão no mutante *p<sub>virB</sub>*, tais como reguladores de transcrição VjbR e GntR, chaperona DnaK, protease HtrA e Omp25 (Wang et al., 2009). Um estudo posterior do mesmo grupo demonstrou a diminuição na expressão e transcrição de OMP no mutante *p<sub>virB</sub>*, sugerindo que o SST4 também interfere na expressão do grupo Omp25/Omp31, o que poderia contribuir para o fenótipo avirulento observado no mutante (Wang et al., 2010). Delpino et al., (2009) analisaram a composição proteica extracelular no sobrenadante de *B. abortus* e mutante *virB10* durante a fase estacionária de crescimento em meio de cultura. Foram detectados 36 spots presentes somente no sobrenadante de *B. abortus* 2308, sendo 11 proteínas identificadas por MALDI/MS. Associado ao *Western blot*, foram identificadas proteínas,

como a chaperona DnaK, PPIase e hidrolase CGH, que potencialmente têm sua secreção, mas não a expressão, afetadas pelo SST4 (Delpino et al., 2009).

Mutantes para proteínas sensoras VjbR e BabR, que compõem o sistema QS em *Brucella* spp. (Weeks et al., 2010), foram comparadas ao perfil proteico de *B. melitensis* 16M, através de gel DIGE (Uruzeau et al., 2010). Das 101 proteínas que apresentavam diferente expressão e que foram identificadas por MS, 35 eram reguladas direta ou indiretamente por VjbR e 66 por BabR, sendo quase 5% dos genes influenciados por pelo menos uma destas proteínas sensoras. As proteínas identificadas foram associadas à resposta ao estresse, adaptação metabólica e virulência, sugerindo que o sistema de QS de *Brucella* spp. possui um importante papel de regulação na adaptação do patógeno ao meio intracelular (Uzureau et al., 2010). Tanto mutantes de *Brucella* spp. para *vjbR* e *babR* como para os componentes do sistema BvrR/BvrS apresentam perfil proteico que mimetiza quadro de estresse nutricional, com aumento da expressão de proteínas periplasmáticas, transportadores ABC e chaperonas (Lamontagne et al., 2007; Uzureau et al., 2010). Além disso, mutantes para *bvrR* ou *bvrS* em *B. abortus* demonstraram diminuição de expressão de OMP (grupo Omp25/ Omp22) e aumento de lipoproteínas em análises proteômicas, evidenciando que o sistema BvrR/BvrS interfere na expressão de proteínas estruturais, além de influenciar no metabolismo de carbono (Guzmán-Verri et al., 2002; Lamontagne et al., 2007).

Para compreender melhor a interação patógeno-hospedeiro, o perfil proteico de *Brucella* spp. tem sido analisado durante a infecção intracelular em macrófagos (Al Dahouk et al., 2008; Lamontagne et al., 2009; Wang et al., 2009).

A análise proteômica por DIGE de *B. suis*, após 48 horas de infecção em macrófagos murinos J774, resultou na identificação de 168 proteínas diferentemente expressas quando comparado com o perfil de *B. suis* em fase estacionária de crescimento em meio de cultivo. Além disso, 44 proteínas apresentaram diferença na expressão durante a infecção intracelular, sendo que a maioria das proteínas diminuídas na fase tardia de infecção está envolvida com o metabolismo primário proteico, energético e de ácido nucleicos em *Brucella* spp. (Al Dahouk et al., 2008). Outro estudo comparou a expressão proteica entre *B. abortus* 2308 e da amostra vacinal *B. abortus* B19 em linhagem RAW de macrófago murino (Lamontagne et al., 2009). *B. abortus* apresentou redução de proteínas envolvidas no metabolismo energético com três horas de infecção, seguida de aumento da expressão de proteínas periplasmáticas e transportadoras de ferro em fases tardias da infecção (20 e 44 horas). Apesar da amostra B19 também apresentar restrição metabólica inicial, esta não foi capaz de se reajustar efetivamente com o curso da infecção (Lamontagne et al., 2009). Assim, ambos os estudos demonstraram estratégias das amostras patogênicas de *Brucella* spp. para se adaptarem ao meio intracelular, reduzindo inicialmente o metabolismo e a síntese proteica e, em seguida, reativando metabolismo e sendo capaz de sobreviver e multiplicar em células do hospedeiro (Al Dahouk et al., 2008; Lamontagne et al., 2009).

O perfil proteômico de *Brucella* spp. durante o crescimento *in vitro* em fase logarítmica tardia, em geral, corresponde ao perfil observado durante o crescimento bacteriano intracelular na fase tardia da infecção, quando está multiplicando no compartimento similar ao RER (Celli et al., 2003; Chaves-Olarte et al., 2012). Desta forma, a análise proteômica diferencial entre amostras de *Brucella* spp. em cultivo laboratorial permite comparar com o que

ocorre durante o tráfego intracelular. Contudo, em *B. ovis*, a escassez de estudos que caracterizam o seu perfil proteico limita a comparação da patogenicidade entre amostras mutantes desta espécie. Portanto, a utilização da análise proteômica tem grande potencial para evidenciar interações entre fatores de patogenicidade e suas interferências sobre o metabolismo e virulência de *B. ovis*.

### 3. OBJETIVOS

Considerando a hipótese de que o transportador ABC de *B. ovis* possui funções específicas durante o cultivo *in vitro* e na multiplicação intracelular, este trabalho teve como objetivo geral verificar o papel do transportador ABC no tráfego intracelular e na expressão de fatores de virulência em *B. ovis*. Para alcançar este objetivo, os objetivos específicos incluíram:

- (i) predição da função do sistema específico ABC (afuncional no mutante  $\Delta abcAB$ );
- (ii) caracterização do tráfego intracelular de *B. ovis* e comparação com mutante  $\Delta abcAB$ ;
- (iii) verificação da interferência do transportador ABC sobre a expressão do SST4;
- (iv) avaliação da interferência do sistema ABC sobre a expressão *in vitro* de fatores de virulência.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Manipulação e cultivo bacteriano

Devido à ausência de potencial zoonótico de *B. ovis*, o cultivo, manipulação e infecção celular foram realizados no laboratório de biossegurança nível 2, no Departamento de Microbiologia e Imunologia Médica da U.C. Davis e no Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da UFMG.

A construção e confirmação do mutante  $\Delta abcAB$  (*B. ovis*  $\Delta BOV\_A500-501, Kan^R$ ), com transportador ABC específico afuncional na ilha de patogenicidade 1, foi descrito anteriormente (Silva et al., 2011), como demonstrado na Tabela 1.

Para o preparo de inóculo, *B. ovis* ATCC 25840 (WT) e mutante  $\Delta abcAB$  (TMS3) foram cultivadas por três dias em placa de *Trypticase Soy Agar* (TSA, BD, EUA) com 5% de sangue ovino ou 10% de hemoglobina (BD, EUA), como descrito anteriormente (Alton et al., 1988). Ampicilina (200  $\mu\text{g/mL}$ ) e/ou canamicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionados ao meio para seleção de mutantes, quando necessário. Para o crescimento adequado de *B. ovis* em meio líquido, uma vez que esta espécie não foi capaz de crescer em meio mínimo descrito por Plommet et al. (1991), o meio rico de *Trypticase Soy Broth* (TSB, BD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA) foi utilizado.

Para a análise proteômica, as amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* foram cultivadas em triplicatas em placa de Petri de 150 mm de diâmetro por três dias a 37°C e 10% CO<sub>2</sub>. Considerando a curva de crescimento de *B. ovis* em placa descrito anteriormente (Silva et al., 2011), foi selecionada a fase de crescimento logarítmico tardio, o qual permite avaliar proteínas expressas de forma consistente.

Para clonagem, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e TOP10 (Invitrogen, EUA) foram cultivadas em meio LB (BD, EUA) ou meio rico SOC (2% tripton, 0,5% extrato levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM glicose), e plaqueadas em meio LB com antibióticos (Tabela 1).

Para avaliar a função do transportador ABC de *B. ovis* em *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium LT2, o mutante

STm $\Delta$ dppA/tppB/oppBC-Kan<sup>R</sup>,Tet<sup>R</sup> (STm $\Delta$ 3) que não possui os três principais transportadores ABC, foi gentilmente cedido pelo laboratório do Dr. John Roth, da U.C. Davis, EUA. *Salmonella* Typhimurium WT e STm $\Delta$ 3 foram cultivadas *overnight* em meio líquido LB ou meio mínimo M9 (47,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,6 mM NaCl, 18,6 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM MgSO<sub>4</sub> e 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) suplementado com 0,4% de glicose e 1  $\mu\text{g/mL}$  de tiamina, com adição de canamicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e tetraciclina (10  $\mu\text{g/mL}$ ), quando necessário.

## 4.2. Clonagem e complementação

Bactérias expressando fluorescência *mCherry* foram construídas para avaliar o tráfego intracelular por microscopia confocal. O plasmídeo pKSoriT-*bla-kan-carb*-*PsojA-mCherry* foi inserido em *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  por eletroporação (Silva et al., 2011), o que resultou na inserção do cassete *mCherry* adjacente ao promotor constitutivo *secE* no cromossomo de *Brucella* spp. (Copin et al., 2012). Colônias em placa TSA com 5% de sangue ovino foram selecionadas pela resistência à ampicilina e pela fluorescência. Os mutantes WT::pKSoriT+mCherry- Kan<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup> e  $\Delta abcAB$ ::pKSoriT+mCherry- Kan<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup> foram denominadas TMS8 e TMS9, respectivamente (Tabela 1).

Para a complementação do mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*, o locus completo *abcA-E* (5,6 Kb) foi amplificado por PCR, utilizando DNA genômico de *B. ovis* ATCC25840 extraído por aquecimento (80°C por 4 horas). Adicionalmente, foi amplificada e inserida uma cauda de histidina (6-His) na região C-terminal da proteína e um *stop codon*. A reação foi preparada com 23  $\mu\text{L}$  de Supermix *High Fidelity*® (Invitrogen, EUA), par de *primers* *abc-his* a 0,7 mM cada (Tabela 2) e 2  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. Para amplificar o produto de grande peso molecular, foi utilizado o seguinte ciclo,

como descrito por Garza et al. (2011): desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 60°C por 6 min, e extensão final a 60°C por 10 min. O produto de 5,6 Kb foi purificado do gel, utilizando kit de purificação QIAEXII (Qiagen, EUA) e inserido no plasmídeo de clonagem pCR2.1 TOPO, como descrito no manual (Invitrogen, EUA).

Em seguida, o inserto foi digerido com enzimas *SpeI* e *KpnI*, purificado e inserido no plasmídeo de expressão e de baixa multiplicação denominado pBBR1-MCS4, Amp<sup>R</sup> (4 Kb). O plasmídeo construído, denominado pTSabc, foi sequenciado com o par de primers M13 (Invitrogen, EUA) (Tabela 2), para confirmar a sequência e orientação do inserto. A construção do plasmídeo pTSabc está ilustrada na Figura 1. O plasmídeo selecionado foi inserido no mutante  $\Delta abcAB$  através de eletroporação (Silva et al., 2011), com aquecimento prévio da bactéria por 30 min a 50°C (Gonzalez et al., 1999), para inativar enzimas de restrição e favorecer a inserção do plasmídeo. As colônias resistentes tanto à ampicilina (Amp<sup>R</sup>) como à canamicina (Kan<sup>R</sup>) foram selecionadas, sendo o mutante complementado ( $\Delta abcAB$ -comp) denominado TMS13 (Tabela 1). A complementação foi confirmada por PCR, utilizando primers BO4 (Tabela 2), e por *Western blot*, através da expressão da cauda de histidina. Adicionalmente, o fenótipo foi testado através *Western blot* para avaliar a expressão de proteínas VirB.

Para a complementação do triplo mutante STm $\Delta$ 3 de *S. Typhimurium* com o locus

*abcA-E* de *B. ovis*, o plasmídeo pTSabc foi inserido por eletroporação, como descrito por Gonzalez et al., (1999). Foram selecionadas as colônias resistentes à tetraciclina (Tet<sup>R</sup>), Kan<sup>R</sup> e Amp<sup>R</sup>. A complementação foi confirmada por *Western blot* com anticorpo anti-histidina.

#### 4.3. Análise genômica e *in vitro* do transportador ABC

A sequência do locus *abcA-E* de *B. ovis* (BOV\_A0500-0504, NCBI), que possivelmente codifica um sistema ABC de transportador de peptídeo (Tsolis et al., 2009; Jenner et al., 2009), foi analisada através de BLASTx (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), o que permite alinhar os dados ao banco de proteínas não redundantes de funções similares.

Ao determinar a função predita para este transportador ABC, o transporte e utilização de determinados nutrientes foram testados durante o crescimento *in vitro* de *B. ovis* WT e mutante em meio rico líquido. Inicialmente, foi avaliado o crescimento em 24 horas das amostras em TSB com a adição de diferentes concentrações (2, 5, ou 10%) de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, cátions bivalentes (inclusive níquel) foram quelados com a adição de diferentes concentrações de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA a 10, 25 ou 50 mM) em meio rico TSB com 10% de SFB. Adicionalmente, foi avaliado o crescimento de ambas as amostras em meio TSB com 10% SFB suplementado com níquel (NiSO<sub>4</sub> a 0,5, 1 ou 2 mM) até 48 horas de incubação em agitador a 37°C.

**Tabela 1. Descrição e referência das amostras de bactérias e plasmídeos utilizados neste estudo.**

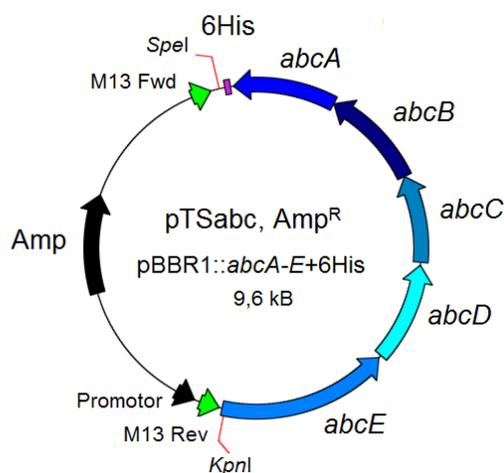
Bactéria ou plasmídeo	Descrição	Referência
Bactéria		
<i>B. ovis</i> WT	<i>B. ovis</i> ATCC25840	ATCC
$\Delta abcAB$ (TMS2)	<i>B. ovis</i> $\Delta BOV\_A500-501::Kan^R$	Silva et al., 2011
WT-mCherry (TMS8)	<i>B. ovis::pKSoriT+mCherry- Kan^R, Amp^R</i>	este estudo
$\Delta abcAB$ -mCherry (TMS9)	<i>B. ovis \Delta abcAB::pKSoriT+mCherry- Kan^R, Amp^R</i>	este estudo
STm WT	<i>S. Typhimurium</i> LT2	ATCC
STm $\Delta 3$ (TT17573)	STm $\Delta oppBC/ tppB/ dppA- Kan^R, Tet^R$	John Roth
STm $\Delta 3$ -comp (TMS14)	STm $\Delta 3::pTSabc - Kan^R, Tet^R, Amp^R$	este estudo
<i>E. coli</i> TOP10	para clonagem	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	para clonagem	-
Plasmídeo		
pBBR-4	pBBR1MCS-4, Amp <sup>R</sup>	Kovach et al., 1995
pKSoriT+mCherry	pKSoriT- <i>bla-kan-carb-PsojA-mCherry</i>	Coplin et al., 2012
pTSabc	pBBR-4:: <i>abcA-E</i> +6His, Amp <sup>R</sup>	este estudo

**Tabela 2. Sequência de iniciadores utilizados em PCR convencional para a confirmação de mutagenese em *Brucella ovis* e *Salmonella Typhimurium* (STm).**

Iniciador	Alvo	Sequência (5'-3') <sup>a</sup>	Produto	Referência
abc-his Fw	<i>B. ovis abcA-E</i>	<u>GGTACCTGTCCGAATAGACGGTTCGT</u>	5,6 Kb	este estudo
abc-his Rev	+6His	<u>ACTAGTCAATGGTGATGGTGATG...</u> <u>...GTGAGCTTTTTCAATAACTCGAAT</u>		
DppA Fw	STm DppA	ATTTTCGCCTGTGCGTTTTA	2,6 Kb*	este estudo
DppA Rev		CGGCAGTGTGATCGAAGATA	Neg (STm $\Delta 3$ )	
TppB Fw	STm TppB	GCCCCGTTTTCACTACAAAA	2 Kb*	este estudo
TppB Rev		ATTTTCGCGCAGGGTAATATG	Neg (STm $\Delta 3$ )	
Opp Fw	STm OppBC	CGATTCCGACGCTGTTTATT	1,8 Kb	este estudo
Opp Rev		TAACGATCTTTCGGGTCGAG		
BO4 FW	<i>B. ovis abcA</i>	TGGTATCTTCAGCCGTTCCAAG	135 pb*	Silva et al., 2011
BO4 REV		ATCTTTGCCCGTTCAGTCG	Neg ( $\Delta abcAB$ )	
M13 Fw	inserto em	GTAAAACGACGGCCAG	-	Invitrogen
M13 Rev	plasmídeo	CAGGAAACAGCTATGAC		

<sup>a</sup>Sequências sublinhadas são enzimas de restrição. Sequência em negrito é cauda de histidina.

\* Neg= PCR negativo para amostra mutante



**Figura 1: Ilustração do plasmídeo pTSabc.** Locus *abcABCDE* de *Brucella ovis* (5,6 Kb), que potencialmente codifica um transportador ABC, foi amplificado e inserido no plasmídeo de expressão pBBR1-MCS4, Amp<sup>R</sup>. 6His= cauda de histidina codificada na extremidade C-terminal da proteína AbcA; *KpnI*, *SpeI*= enzimas de restrição no sítio de inserção; Amp= cassete de resistência à ampicilina. M13= sítio iniciador de amplificação para sequenciamento.

#### 4.4. Avaliação do transportador ABC de *B. ovis* em *Salmonella Typhimurium*

Antigos estudos têm demonstrado que *S. enterica* sorotipo Typhimurium (STm) e *Escherichia coli* apresentam somente três classes de transportadores ABC de peptídeos, denominadas dipeptídeo (Dpp), tripeptídeo (Tpp) e oligopeptídeo (Opp), de acordo com o tamanho do substrato (Gibson, et al., 1984; Hiles et al., 1987; Abouhamad et al., 1991). Foram descritos peptídeos tóxicos para *S. Typhimurium* e *E. coli* que são captados por transportadores específicos e que, na ausência deste transportador, a bactéria se torna resistente (Gibson, et al., 1984; Andrews e Short, 1985). Portanto, é possível avaliar a função do transportador ABC de *B. ovis* em *S. Typhimurium* através da resistência aos peptídeos tóxicos, utilizando um triplo mutante (STmΔ3) sem os três sistemas de transportador ABC. O mutante STmΔ3 foi gentilmente cedido por J. Roth, do Departamento de Microbiologia da U.C. Davis.

Inicialmente, a deleção de *oppBC*, *dppA* e *tppB* no mutante STmΔ3 foram confirmadas por PCR, utilizando os pares de *primers*

descritos na Tabela 2. Adicionalmente, foi comparada a atividade metabólica *in vitro* entre as amostras STm WT e STmΔ3 cultivadas em meio mínimo líquido M9 com 0,4% de glicose, 1 μg/mL de tiamina e cloreto de tetrazólio (TTC), suplementado ou não com os 20 aminoácidos (1 mM cada). Em seguida, as amostras STm WT, STmΔ3 e mutante complementado com transportador *abcA-E* de *B. ovis* (STmΔ3-comp) foram testadas quanto à sensibilidade aos peptídeos tóxicos alafosfalina (L-alanil-L-1-ácido aminoetilfosfônico) e tri-lisina (Sigma-Aldrich, EUA), os quais são transportados por Tpp e Opp, respectivamente.

As três amostras STm WT, STmΔ3 e STmΔ3-comp foram cultivadas *overnight* em meio mínimo líquido M9 e ajustadas a concentração para  $3 \times 10^5$  UFC/mL em uma nova solução líquida de M9 com ágar nobre estéril a 0,7% (BD, EUA). Esta nova solução foi acrescentada às placas contendo meio mínimo M9 sólido com antibióticos. Após a solidificação do meio, discos de papel de 7 mm de diâmetro foram posicionados sobre a placa e acrescentado 10 μL de alafosfalina (0,5 mg ou 1 mg) e tri-

lisina (0,2 mg ou 0,4 mg). Após a secagem dos discos, as placas foram invertidas e incubadas por 16 horas em estufa a 37°C. A sensibilidade das três amostras aos peptídeos tóxicos foi determinada através da mensuração (mm) do halo de inibição do crescimento bacteriano. O resultado foi representativo de três experimentos independentes.

#### 4.5. Cultivo e infecção *in vitro* de linhagens celulares HeLa e RAW

As linhagens celulares de macrófago murino RAW 264.7 (TIB-71<sup>TM</sup>) e epitelial humano HeLa (CCL2<sup>TM</sup>) foram adquiridas de *American Type Culture Collection* (ATCC). Para confirmar o fenótipo de *B. ovis*  $\Delta abcAB$  após nova mutagênese realizada em UC Davis - EUA, linhagem celular de macrófagos murino RAW 264.7 foi cultivada e infectada, como descrito previamente (Silva et al., 2011). Resumidamente, macrófagos RAW foram cultivados em meio RPMI (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e transferidos 0,5 mL de solução contendo 10<sup>6</sup> células/mL para placas de 24 poços. Após 24 h, células RAW foram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 100 *B. ovis* WT ou  $\Delta abcAB$  e estimada a sobrevivência intracelular com 0, 4 e 24 horas pós infecção (hpi).

Em seguida, células HeLa (linhagem imortalizada de células epiteliais humanas) foram utilizadas para comparar a cinética de infecção e o tráfego intracelular de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$ . Células HeLa foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio DMEM (Gibco, EUA) contendo 10% de SFB e infectadas, como descrito por Pizarro-Cerdá et al. (1998a). Ao atingir 80-90% de confluência nos frascos, as células foram tratadas com Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, EUA) por 10 min, contadas em câmara de Neubauer e transferidas em 500  $\mu$ L de meio DMEM (2x10<sup>5</sup> células/mL) para cada poço em placa

de cultivo celular de 24 poços. Para microscopia confocal, 500  $\mu$ L de meio contendo 6x10<sup>4</sup> células/mL foram transferidos para poços contendo lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro.

Após incubação por 24 horas, células HeLa foram infectadas com MOI de 1000 *B. ovis* WT ou  $\Delta abcAB$ . As placas foram centrifugadas por 5 min a 400 x g e incubadas por 30 min a 37°C. As amostras foram lavadas com PBS Dulbecco (DPBS, Gibco, EUA), para remover as bactérias não aderentes, e adicionadas meio DMEM com 50  $\mu$ g/mL de gentamicina (Gibco, EUA), para inativar bactéria extracelular. A sobrevivência intracelular de cada amostra foi calculada com 0, 8, 24, e 48 horas pós infecção (hpi). Assim, células HeLa infectadas foram lisadas com Tween 20 a 0,5% por 10 min, lavadas com 500  $\mu$ L de DPBS, seguida de diluição seriada e plaqueamento em TSA com 5% de sangue ovino.

Para confirmar o fenótipo de *B. ovis* durante a expressão da fluorescência *mCherry*, células HeLa foram infectadas com MOI 1:1000 de amostras WT-*mCherry* (TMS8) ou  $\Delta abcAB$ -*mCherry* (TMS9), como descrito previamente.

#### 4.6. Análise do tráfego intracelular por microscopia confocal

Considerando que o mutante  $\Delta abcAB$  é incapaz de sobreviver e multiplicar no compartimento intracelular em macrófagos (Silva et al., 2011), foi analisado o papel do transportador ABC durante o tráfego intracelular. Células HeLa foram infectadas com *B. ovis* WT ou  $\Delta abcAB$  expressando *mCherry* (TMS8 e TMS9), como descrito anteriormente. Após 8, 24 e 48 horas de infecção, cada poço foi lavado três vezes com DPBS, fixado com paraformaldeído a 3% em PBS a 37°C por 20 min, lavado novamente com DPBS e incubado por no mínimo 10 min em 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl em

PBS. Após retirar as lamínulas, as amostras foram permeabilizadas por 30 min a temperatura ambiente com solução tampão (10% de soro equino e 0,1% de saponina em PBS). Em seguida, as amostras foram imunomarcadas por 1 hora com anticorpo de coelho anti-LAMP1 humano diluído a 1:1000 (Thermo Scientific, EUA), lavadas com PBS, e imunomarcadas por 1 hora com anticorpo anti-coelho com fluorescência Alexa Fluor 488 (Lifetech, EUA) diluído a 1:1000. As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS, uma vez com água destilada e montadas em lâminas com meio Mowiol (Calbiochem, EUA). Cada amostra foi analisada pela captura de imagens 1024x1024 pixels de 100 células por amostra através de microscópio de laser confocal Carl Zeiss LSM 510. Foram realizados três experimentos independentes de cada amostra em todos os tempos.

#### **4.7. Análise de expressão do SST4 por Western blot**

O mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* não é capaz de sobreviver intracelularmente em macrófagos (Silva, et al 2011), o que se assemelha ao fenótipo descrito para mutante com SST4 afuncional, como descrito por Sá et al. (2012). Considerando estes resultados, foi avaliado a expressão de proteínas VirB, que constituem o SST4, durante o crescimento *in vitro* de WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*. As amostras foram cultivadas em meio rico TSA com 5% de sangue ovino por três dias e transferidas para meio líquido TSB com 10% de SFB ajustando OD<sub>600</sub> inicial para 0,1. Após crescer *overnight* em agitador a 37°C, 1 mL de cada amostra foi centrifugada a 5000 x g por 3 min a 37°C, ressuspendida em 4% de solução tampão para SDS e fervida por 10 min.

Sabe-se que a expressão de SST4 em *Brucella* spp. é induzida em meio ácido e durante estresse nutricional (Boschioli et al., 2002; de Jong et al., 2008). Assim, uma alíquota de cada amostra foi centrifugada e

transferida para meio mínimo E com pH 5,0, sendo incubada por mais 6 horas em agitador a 37°C, como descrito anteriormente (Kulakov et al., 1997; de Jong et al., 2008). Adicionalmente, foi analisada a expressão do SST4 durante o crescimento de *B. ovis* em meio rico em placa. Assim, uma alíquota de WT e mutante  $\Delta abcAB$  raspados diretamente da placa TSA com 5% de sangue ovino foram fervidas em solução tampão e analisadas por *Western blot*.

Para *Western blot*, as amostras proteicas (10 a 20 µg) foram submetidas a eletroforese em gel de poli(acrilamida a 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de transferência de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poro de 0,45 µm (Millipore, EUA), utilizando câmera de transferência úmida a 15 V por 45 min. As membranas foram incubadas com solução de bloqueio (leite em pó com Tween 20 a 0,05%) por 1 hora e incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal de coelho anti-VirB8, anti-VirB9 ou anti-VirB11 diluído a 1:5000 em solução de bloqueio. No dia seguinte, as membranas foram lavadas três vezes com solução de bloqueio e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a HRP (Biorad, EUA) diluído a 1:5000. A atividade de HRP foi detectada com um substrato quimioluminescente (Perkin-Elmer, EUA). Para confirmar se a concentração proteica entre as amostras eram similares, foi feita eletroforese de gel SDS-PAGE com as mesmas amostras analisadas no *Western blot*, sendo o gel corado por *Coomassie Brilliant Blue*.

#### **4.8. Indução *in vitro* do SST4 por ácido urocânico**

Sabe-se que em meio com restrição nutricional e baixo pH, a expressão de proteínas do SST4 pode ser induzida pela adição de ácido urocânico, o qual induz a

expressão das proteínas reguladoras VjbR e HutC (Sieira et al., 2010; Arocena et al., 2012). Portanto, foi analisado se a expressão de VirB no mutante  $\Delta abcAB$  é favorecida pela presença de ácido urocânico e meio mínimo ácido.

As amostras *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  foram cultivadas em meio líquido TSB com 10% de SFB *overnight* em agitador a 37°C e um alíquota ( $1 \times 10^9$  UFC/ amostra) foi transferida para o meio mínimo E pH 5,0, suplementado com ácido urocânico 5mM ou ácido glutâmico 5 mM (controle). Após 4 horas em agitador a 37°C, 1 mL de cada solução foi transferida para um tubo, centrifugada e fervida com 4% de solução tampão de SDS. Em seguida, foi comparada a expressão de proteínas do SST4 entre as amostras através de *Western blot*, utilizando anticorpo anti-VirB8, como descrito anteriormente.

#### 4.9. RT-PCR em tempo real do SST4 durante crescimento *in vitro*

A transcrição de genes em *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  foram determinados por RT-PCR em tempo real. Após o crescimento *in vitro* em meio TSB com 10% SFB no agitador a 37°C por 24 horas, 1 mL do cultivo bacteriano foi transferido para tubo, centrifugado e o RNA bacteriano extraído utilizando o reagente TRI (Molecular Research Center, Cincinnati). Resumidamente, o sedimento de bactéria foi ressuspensionado em 0,5 mL de reagente TRI® (Molecular Research Center, EUA), homogeneizado com 0,1 mL de clorofórmio e mantido a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C e a fase aquosa transferida para novo tubo com 0,25 mL de isopropanol, para precipitar o RNA. Após a centrifugação a 12.000 x g por 8 min, lavagem do *sedimento* com 0,5 mL de etanol 75% e secagem, o RNA foi ressuspensionado em 100 µL de água livre de RNase e tratado com kit *Rneasy Minelute*

*cleanup* (QIAGEN, EUA), como descrito pelo fabricante. Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen, EUA) por 1 hora e conservadas a -80°C.

Para a confecção do DNA complementar (cDNA), a transcrição reversa foi realizada utilizando 10 µL de RNA e reagentes do kit TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), sendo submetido ao ciclo de 25°C por 10 min, 48°C por 30 min e 95°C por 5 min. Para confirmar que as amostras não apresentavam contaminação por DNA genômico, uma nova mistura foi feita utilizando 5 µL de RNA e todos os reagentes, exceto a enzima transcriptase reversa. Foram utilizados 4 µL de cDNA para cada reação de PCR em tempo real, com volume total de 25 µL. Para a reação, foram utilizados 12,5 µL de SYBR-Green (Applied Biosystems), 7,25 µL de água ultrapura e 0,3 µM de cada iniciador (Tabela 3). Níveis de transcrição de *virB1*, *virB8*, *vjbR*, *hutC* foram analisados. Adicionalmente, para confirmar a deleção do transportador ABC no mutante, foi analisado o nível de transcrição de um gene do transportador ABC deletado (*abcA*) e de outro gene anterior à região deletada (*abcC*). O nível de transcrição das amostras foram normalizados com base em valores do RNA ribossomal 16S conservado em proteobactérias (Tabela 3). Os valores de Ct e erro padrão das amostras WT e  $\Delta abcAB$  foram expressas em relação à amostra  $\Delta abcAB$ .

#### 4.10. Análise estatística

Valores em unidade formadora de colônia (UFC) e percentagem sofreram transformação logarítmica e radial, respectivamente, antes da análise de variância (ANOVA). Foi realizado teste de normalidade dos dados, sendo as médias dos grupos comparadas pelo teste de Tukey (GraphPad Instat3, EUA) e considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . Os

**Tabela 3. Iniciadores utilizados para RT-PCR em Tempo Real para RNAm de *Brucella ovis*.**

Iniciadores	Produto	Sequência	Referência
Univ RT Fw	RNAr 16S*	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	este estudo
Univ RT Rev		ATTACCGCGGCTGCTGGC	
BOVA500 RT Fw	<i>abcA</i>	CTACGCTCGCGCTCTCTATT	este estudo
BOVA500 RT Rev		ACCGCCAGCGACATATAAAC	
BOVA503 RT Fw	<i>abcC</i>	ATGTGGCCTACGCTGAAACT	este estudo
BOVA503 RT Rev		AGCCAGAATTGCGGTAGAGA	
VirB1 RT-Fw	<i>virB1</i>	TGTTACTACGCCGGCAACTT	este estudo
VirB1 RT-Rev		CAGCAATCGGCTTTGTGGTC	
VirB8 RT-Fw	<i>virB8</i>	TAAAGAACGGGCAGGGCAAT	este estudo
VirB8 RT-Rev		CACGGTAATGGTGCCGAAAG	
VjbR RT Fw	<i>vjbR</i>	GGTTTTTCAGGAAGACGCTC	este estudo
VjbR RT Rev		AAGATTTCCCAGGCCGTGC	
HutC RT Fwd	<i>hutC</i>	TTTGAACACGAGCTGACCGA	Arocena et al.,
HutC RT Rev		TGCGATTGCGGGAACGACA	2012

\*RNA ribossomal

resultados de microscopia confocal e tempo real representam média geométrica e erro padrão de três experimentos independentes. Para PCR em tempo real, os valores de Ct foram comparados entre os dois grupos pelo teste t de Student, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.11. Análise proteômica de *B. ovis* e mutante $\Delta abcAB$

Considerando que a ausência de um transportador/importador de peptídeo no mutante  $\Delta abcAB$  interfere na expressão proteica do patógeno, foi realizada uma análise proteômica por gel bidimensional (2D) e por gel fluorescente (DIGE), para comparar com amostra WT de *B. ovis*. Toda a análise proteômica foi realizada no Departamento de Parasitologia, do Instituto Ciências Biológicas- ICB, na UFMG.

##### 4.11.1. Extração de proteínas

As amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* foram cultivadas em triplicatas em placa de TSA com 10% de hemoglobina por três dias. Cada amostra foi retirada das placas e ressuspensa em 10 mL de meio DMEM sem bicarbonato (Gibco, Brasil) para a

lavagem do sedimento bacteriano. As amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 7 min, descartado o sobrenadante, e o sedimento ressuspensa em 10 mL de meio DMEM. Esse procedimento foi repetido três vezes para retirar resíduos do meio de cultura bacteriano. Após a secagem do sedimento, as amostras foram conservadas a -80 °C até serem lisadas.

Para cada sedimento bacteriano, foi adicionado o dobro de volume de tampão de lise (uréia 8 M, tiuréia 2 M, CHAPS 4%, Tris HCl 40 mM e mix de inibidores de proteases) (GE Healthcare, Suécia). Os tubos contendo o lisado bacteriano foram mantidos sob agitação a temperatura ambiente por 3 horas, seguido de passagem (10 vezes) em seringa com agulha 26G, para completar a lise celular. As amostras foram centrifugadas a 20.000 x g, 30 min e o sobrenadante recolhido e conservado em alíquotas a -80 °C. A proteína recuperada no lisado bacteriano foi quantificada pelo kit 2D Quant (GE Healthcare, Suécia), utilizando albumina bovina (BSA) para a curva padrão de proteína, como descrito pelo fabricante. A qualidade proteica foi verificada por eletroforese de 20 µg por amostra em gel SDS-PAGE a 12% de

acrilamida corado por *Coomassie Brilliant*  
4.11.2. *Análise proteica por gel bidimensional*

No gel bidimensional (2D), a separação proteica foi realizada por ponto isoelétrico, através de focalização isoelétrica, e pela massa molecular, através de eletrofores em SDS-PAGE. Inicialmente, para a focalização isoelétrica, 800 µg de cada amostra proteica extraída foi adicionada à solução de reidratação (1% de tampão IPG pH 4-7 e tampão IEF) no volume total de 340 µL (GE Healthcare, Suécia). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas *overnight* em tiras IPG de 18 cm com pH 4-7 (GE Healthcare, Suécia), em aparato de reidratação (*Immobiline Dry Strip Reswelling Tray*, GE Healthcare, Suécia). No dia seguinte, foi realizada a focalização isoelétrica, utilizando o sistema Ettan™ IPGphor™ 3 IEF (GE Healthcare, Suécia), como descrito por J. Mol (2012) para *B. abortus*. O programa utilizado para a focalização foi: 300 V por 4 horas, seguida de voltagem crescente até acumular os valores de 300 Vh, 4000 Vh, 1250 Vh; e por fim, 500 V por 1 hora.

A segunda dimensão foi realizada em aparato de eletroforese vertical, sendo as tiras de IPG mantidas por 15 min em 10 mL de solução de equilíbrio (uréia 6 M, Tris/HCl pH 8,8 a 50 mM, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,001%) com ditioneitol (DTT) a 10 mg/mL, seguida de 15 min em solução de equilíbrio com iodocetamida a 25 mg/mL. As tiras foram posicionadas em cima de gel de poliacrilamida a 12% de 1 mm de espessura e firmadas com gel de agarose a 0,5%. As amostras foram submetidas a eletroforese a 400 V, 300 mA por 4 horas em aparelho de eletroforese vertical (Ettan DALTsix *Electrophoresis Unit* – GE Healthcare, Suécia). Por fim, as proteínas foram fixadas e coradas por *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250, e o gel digitalizado utilizando o *scanner ImageScanner*

*Blue*.

(Amersham Biosciences, Inglaterra) e analisado por *ImageMaster™ 2D Platinum* (GE Healthcare, Suécia). A reprodutibilidade do perfil proteico foi avaliada pela quantificação do número de *spots* em comum detectados entre as triplicatas das amostras WT e  $\Delta abcAB$ , sendo construídos gráficos de dispersão em relação ao gel padrão de análise (*Master*). Em seguida, a diferença de expressão proteica entre ambas as amostras de *B. ovis* foi analisada pela eletroforese diferencial em gel fluorescente (denominado DIGE).

#### 4.11.3. *Eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE)*

A técnica de DIGE permite analisar perfil proteico através da marcação sensível de maior número de amostras com diferentes corantes, o que minimiza a variabilidade dos padrões de *spots* entre os géis e reduz o número de géis utilizados por experimento (Wu et al., 2006). Assim, foi comparado o perfil proteico entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* durante o crescimento *in vitro* em meio rico em placa.

As amostras de proteínas mantidas a -80°C foram descongeladas e, quando necessário, o pH foi ajustado para 8,5. Para cada 50 µg de proteína foi adicionado 400 pmol do corante Cy2, Cy3 ou Cy5 (GE Healthcare, Suécia). Para eliminar a interferência devido à diferença de intensidade dos corantes usados, os corantes Cy3 e Cy5 foram invertidos (denominado *dye swap*) entre a mistura das triplicatas de WT e  $\Delta abcAB$  usadas em cada gel. O terceiro corante (Cy2) foi utilizado para marcar a mistura de uma fração de proteínas de ambas as amostras, sendo utilizado como padrão interno da reação (Tabela 4).

Após a adição dos corantes, as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas e incubadas no gelo por 30 min, protegidos da luz. Para cessar a ligação do corante com a

proteína, 1 µL de L-lisina 10 mM foi acrescentado por amostra, homogeneizada, centrifugada e colocada no gelo por 10 min. As amostras marcadas foram misturadas em um tubo e adicionado 450 µg da mistura equitativa das triplicatas de WT ou mutante  $\Delta abcAB$  não marcadas, totalizando 600 µg de proteína por gel (Tabela 4). A adição de proteína não marcada permite, posteriormente, a visualização dos *spots* através de coloração do gel por *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

Em seguida, 3,4 µL de tampão IPG (10 µL/mL) e tampão IEF (8 M de uréia, 2 M de tiuréia, 4% w/v de CHAPS, 10 mg/mL de ditioeritritol) foram acrescentadas por mistura, para o volume final de 340 µL. Após a homogeneização da mistura, as amostras foram incubadas com as tiras de 18 cm de pH 4-7, como descrito anteriormente para gel 2D.

Após as tiras serem incubadas em solução de equilíbrio, estas foram posicionadas sobre gel de polacrilamida a 12% de 0,75 mm de espessura e firmadas com gel de agarose a 0,5%. As amostras foram, inicialmente, submetidas a eletroforese a 10 mA/gel e, em seguida, a 45 mA/gel por 5 horas, em aparelho de eletroforese vertical, sob proteção da luz. Os géis foram digitalizados utilizando o aparato *Typhoon FLA 9000* (GE Healthcare, Suécia) com excitação/emissão específica para os corantes Cy3 (532 nm/verde), Cy5 (633 nm/vermelho) e Cy2 (488 nm/azul). Para serem utilizadas na análise por espectrometria de massa, as proteínas foram fixadas, coradas por *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250, digitalizadas e analisadas quanto à presença e intensidade dos *spots* pelo programa *DeCyder 2D 7.0 Differential Analysis* (GE Healthcare, Suécia).

#### 4.11.4. Análise de DIGE através do programa *DeCyder*

Inicialmente, imagens fluorescentes dos géis DIGE foram copiladas e transferidas para o programa *DeCyder 2D* (GE Healthcare, Suécia), seguindo as instruções do fabricante. No primeiro modo DIA (*Differential In-gel Analysis*), onde é feito a análise intragel, os *spots* foram quantificados e coidentificados automaticamente nas três imagens (Cy2, Cy3 e Cy5) recuperadas de cada gel. A abundância de proteína em *spot* foi quantificada e expressa a razão do volume entre as imagens dos corantes Cy3 e Cy5. Além disso, *spots* identificados na imagem do corante Cy2 foram utilizados como padrão interno e comparados entre os quatro géis.

Em seguida, o modo BVA (*Biological Variation Analysis*) foi utilizado para identificar os *spots* comuns entre os diferentes géis, sendo esta uma análise intergel. O modo BVA permite a comparação quantitativa da expressão proteica em múltiplos géis DIGE, sendo calculado a abundância média para cada *spot*. Adicionalmente, foi feita análise estatística dos *spots* entre os grupos WT e  $\Delta abcAB$  através do teste T de Student e considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . Proteínas que apresentaram aumento ou diminuição significativa da expressão (diferença quantitativa) ou que estavam presentes somente em um dos grupos (diferença qualitativa) foram selecionadas para a identificação por espectrometria de massa.

Por fim, o modo EDA (*Extended Data Analysis*) foi utilizado para a análise multivariada do perfil proteico obtido nos géis 2D DIGE. Neste modo, foram elaborados: um mapa proteico (denominado *heat map*), que demonstra a intensidade média da proteínas expressas em cada grupo; e a análise de componentes principais (PCA), para obter a distribuição proteica e verificar as proteínas discrepantes ou *outliers*.

**Tabela 4. Mistura de proteínas de *Brucella ovis* utilizada para eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE).**

Mistura	Corante				Total
	Cy3	Cy5	Cy2	não corado	
gel 1	WT	$\Delta abcAB$	WT+ $\Delta abcAB$	WT	600 $\mu$ g
gel 2	$\Delta abcAB$	WT	WT+ $\Delta abcAB$	WT	600 $\mu$ g
gel 3	WT	$\Delta abcAB$	WT+ $\Delta abcAB$	$\Delta abcAB$	600 $\mu$ g
gel 4	$\Delta abcAB$	WT	WT+ $\Delta abcAB$	$\Delta abcAB$	600 $\mu$ g
<b>Concentração proteica</b>	50 $\mu$ g	50 $\mu$ g	50 $\mu$ g	450 $\mu$ g	

#### 4.11.5. Extração de proteína em spot do gel DIGE

Para a extração proteica, os spots que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de expressão entre WT e  $\Delta abcAB$  foram identificados e recortados do gel DIGE corado por *Coomassie Brilliant Blue*. Cada spot foi descorado com 25 mM de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  pH 8,0 (Synth, Brasil) e 50% de acetonitrila (Sigma-Aldrich, EUA), secado em microcentrífuga a vácuo (*Speed Vac*, Eppendorf) e lisado com 30  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina (20 ng/ $\mu\text{L}$  em bicarbonato de amônio 50 mM) por 16 horas a 37°C. Em seguida, as proteínas foram extraídas com 30  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila 50% por 30 min e concentradas a 10  $\mu\text{L}$  em microcentrífuga a vácuo, tratadas em colunas *ZipTip®* C18 (Millipore, EUA), como descrito pelo fabricante, e identificadas por espectrometria de massa.

#### 4.11.6. Espectrometria de massa

Para a espectrometria de massa, uma placa foi preparada com a mistura de 0,5 a 1  $\mu\text{L}$  da solução da amostra com 0,5 vol da solução matriz saturada (10 mg/mL de R-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% acetonitrila e 0,1% ácido trifluoroacético) (Sigma-Aldrich, EUA). Os dados para a identificação de proteínas foram obtidos no espectrômetro de massa *MS Autoflex III Smartbeam MALDI TOF/TOF™ System* (Bruker, EUA). Todas as informações adquiridas para cada proteína

(relação massa/carga e intensidade dos picos) foram copiladas em um arquivo e analisado pelo MASCOT (Matrix Science, EUA, <http://www.matrixscience.com>). Com o MASCOT, foi realizada uma busca proteica contra todo o banco de dados depositados no NCBI. Os parâmetros usados na busca foram ajustados para permitir alterações nos peptídeos, tais como: um sítio de clivagem da tripsina perdido; modificações variáveis, como oxidação da metionina (Met); modificações fixas, como carbamidometilação da cisteína (Cys); e a formação de piroglutamato (pyro-Glu) na extremidade N-terminal da glutamina (Gln). Além disso, a tolerância de massa para os peptídeos analisados foi de 0,8 Da para espectro MS e 0,6 Da para MS/MS.

Proteínas identificadas com escore significativo no MASCOT foram posteriormente analisadas quanto à sua função, através de banco de dados na Uniprot (<http://www.uniprot.org>) e NCBI. A massa e ponto isoelétrico estimados para cada spot através do MASCOT foram comparados aos valores experimentais obtidos nos géis 2D através do programa *ImageMaster™ 2D Platinum*. Além disso, as interações entre as proteínas de cada grupo experimental foram avaliadas através do software *String (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, http://string-db.org)*, no qual utiliza banco de dados de interações proteicas conhecidas e preditas para elaborar redes de interação. O software inclui associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) derivadas de

contexto genômico, experimentais, co-expressão e de publicações prévias.

Interação proteica foi ilustrada em redes, indicando associação entre as proteínas de acordo com tipos de evidências, através das seguintes cores de linhas: verde – vizinhança; vermelho – fusão gênica; azul – co-ocorrência; preto – co-expressão; roxo – dados experimentais; azul claro – base de dados; e amarelo – publicações.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

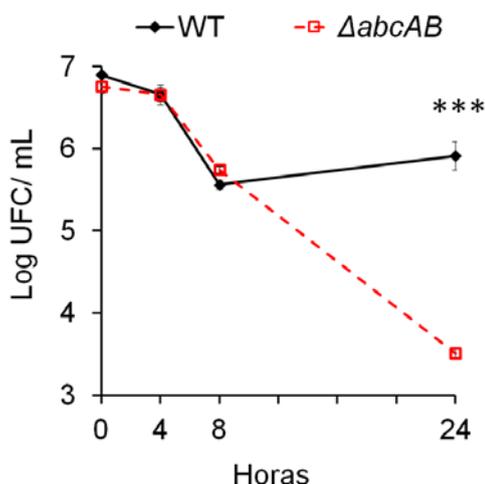
### 5.1. Confirmação do fenótipo de *B. ovis* $\Delta abcAB$ após mutagênese

Para confirmar que a deleção em *B. ovis* realizada no laboratório da UC Davis resultou no mutante  $\Delta abcAB$  com o mesmo fenótipo observada (Silva et al., 2011), foi realizada a infecção *in vitro* em linhagem de

macrófago murino RAW. A amostra  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* apresentou a mesma cinética de infecção descrita por Silva et al. (2011), sem diferença significativa de colonização até 8 horas pós infecção, seguida de atenuação com 24 horas (Figura 2). Este resultado permitiu dar continuidade às análises comparativas *in vitro* de  $\Delta abcAB$  com *B. ovis* WT.

### 5.2. Predição do sistema ABC em *B. ovis* através de análise genômica

Para prever a função do transportador codificado pelo locus *abcA-E* de *B. ovis* (BOV\_A0500-0504), a sequência de nucleotídeos foi analisada através de BLASTx. Os dados foram alinhados ao banco de proteínas do NCBI, o que permitiu identificar estruturas proteicas com funções similares.



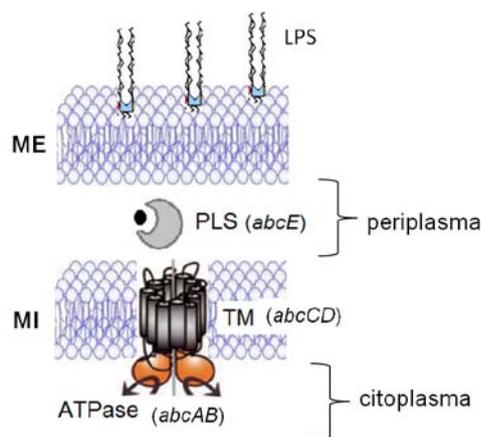
**Figura 2: Sobrevivência intracelular de *Brucella ovis* e mutante  $\Delta abcAB$  em linhagem celular RAW 264.7 de macrófagos murinos.** Macrófagos foram infectados com MOI 1:100 de *B. ovis* WT ou  $\Delta abcAB$ . As amostras foram avaliadas quanto à sobrevivência intracelular após 0, 4, 8 e 24 horas de infecção (hpi). *B. ovis* WT é capaz de multiplicar em macrófagos RAW, enquanto mutante  $\Delta abcAB$  não sobreviveu intracelularmente. Dados representam média geométrica e erro padrão de dois experimentos independentes. Diferença significativa entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$  está indicada por asteriscos (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

As proteínas codificadas pelos genes *abcA* (BOV\_A0500) e *abcB* (BOV\_A0501), ambos deletados no mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*, foram similares à proteína ligadora a ATP (denominada ATPase), apresentando os domínios *Walker A* e *Walker B*, que são conservados em todos os sistemas ABC. Assim, o mutante  $\Delta abcAB$  potencialmente apresenta proteína transportadora afuncional. Adicionalmente, as ATPases apresentaram 99% de identidade com proteínas de duas amostras de *Brucella* (*B. pinnipedialis* B2/94 e *Brucella* sp. 63/311) e 91% de identidade com proteínas de *O. antrope* e *O. intermedium*, que são bactérias filogeneticamente semelhantes ao gênero *Brucella*. As proteínas codificadas pelos genes *abcC-E* (BOV\_A0502-0504) foram identificadas como pertencentes ao sistema ABC responsável por transportar dipeptídeo, oligopeptídeo ou níquel (Dpp/Opp/Nik). Os genes *abcC* e *abcD* (BOV\_A0503 e BOV\_A0504) codificam proteínas com conformação em  $\alpha$ -hélice similares à proteínas de membrana do sistema ABC, sendo responsáveis pela formação do poro na membrana. O gene *abcE* (BOV\_A0504) codifica uma proteína

ligadora ao substrato Dpp/Opp/Nik, o que demonstra que este sistema na *B. ovis* está provavelmente associado à importação de substrato (Figura 3). Portanto, estes resultados sugerem que transportador ABC de *B. ovis* tem a função de importar um dipeptídeo, oligopeptídeo e/ou níquel.

### 5.3. Níquel não interfere no crescimento *in vitro* do mutante $\Delta abcAB$

Considerando a análise genômica, foi comparado o crescimento *in vitro* de *B. ovis* WT e do mutante transportador ABC afuncional ( $\Delta abcAB$ ) na presença de diferentes substratos e quelantes. Para isso, foi desenvolvido um meio líquido rico que permitisse o crescimento *in vitro* de *B. ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$ . Sabe-se que para o crescimento adequado de *B. ovis*, é necessária a adição de 5% de soro ou sangue no meio sólido (Alton et al., 1988). Já que espécies clássicas de *Brucella* spp. crescem em meio TSB (BD, EUA), foi utilizado este meio como base, sendo adicionado diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB, Gibco, EUA).



**Figura 3: Ilustração do sistema ABC de importação e de genes em *Brucella ovis* que potencialmente codificam as proteínas estruturais.** Os genes *abcA* e *abcB* codificam proteínas ligadoras à ATP (ATPase) presentes no citoplasma. Os genes *abcC* e *abcD* codificam proteínas de transmembrana (TM) em  $\alpha$ -hélice, formando o poro. O gene *abcE* codifica a proteína ligadora ao substrato (PLS), localizada no periplasma, sugerindo que o sistema ABC *abcA-E* de *B. ovis* está associado à importação de substrato. ME= membrana externa; MI= membrana interna. Referência: van der Heide e Poolman, 2002, com modificações.

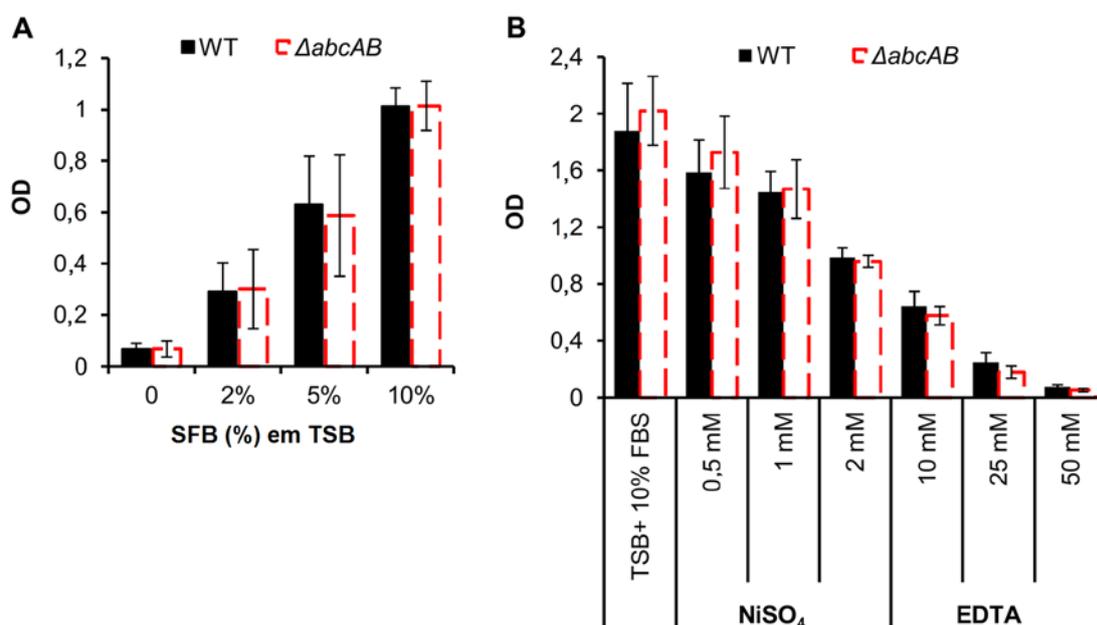
As amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* apresentaram crescimento proporcional à concentração de SFB (2, 5 ou 10%) adicionado ao meio TSB. Como controle, ambas as amostras foram inoculadas em meio TSB sem SFB, no qual apresentaram limitado crescimento até 24 horas (Figura 4A). Em seguida, ao determinar que o meio TSB com 10% de soro permite o crescimento exponencial das amostras WT e  $\Delta abcAB$ , foi analisado a importância de níquel e outros cátions bivalentes no meio, através de adição do quelante EDTA (10, 25 ou 50 mM). As amostras WT e  $\Delta abcAB$  não apresentaram diferença de crescimento após 48 horas de incubação, o que sugere que o transporte de cátions bivalentes (inclusive de níquel) independe da presença do transportador ABC (Figura 4B). Adicionalmente, a suplementação de níquel (0,5; 1 ou 2 mM de  $NiSO_4$ ) no meio TSB com 10% de SFB não favoreceu o crescimento do mutante  $\Delta abcAB$ , nem da amostra WT (Figura 4B).

Foram caracterizados três principais transportadores de níquel que são conservados em *Brucella* spp.: um sistema ABC ortólogo ao *nikA-E* de *E. coli*, e dois transportadores da classe *Energy Coupling Factor* (ECF), que são codificados por *nikK-O* e *ure2* (Jubier-Maurin et al., 2001; Sangari et al 2010). Em *B. ovis*, análise genômica revelou que dois genes de *ure2* (BOV\_1316 e BOV\_1319) e *nikD* (BOV\_A0751) são considerados pseudogenes (Tsolis et al., 2009), o que poderia comprometer a função destes na importação de níquel. Contudo, o sistema ECF *nikK-O* é conservado em *B. ovis* e possivelmente funcional, o que poderia compensar o transporte de níquel no mutante  $\Delta abcAB$ . Assim, não se pode excluir a hipótese que o transportador ABC atue no transporte de níquel em *B. ovis*.

#### 5.4. Expressão *in vitro* do transportador ABC de *Brucella ovis* em *Salmonella Typhimurium*

Há evidências de que *Salmonella Typhimurium* (STm) codifica somente três classes de sistema ABC para a captação de peptídeos (Dpp, Tpp e Opp), sendo estes caracterizados de acordo com o tamanho e tipo do substrato (Neider e Becker, 1975; Gibson, et al., 1984). Alguns peptídeos, como tri-lisina e alafosfalina, são tóxicos quando importados para o citoplasma de STm, sendo que, na ausência de seus transportadores, a bactéria se torna resistente (Gibson, et al., 1984; Andrews e Short, 1985). Considerando a facilidade de crescer STm em meio mínimo com fonte restrita de nitrogênio, o que permite comparar crescimento com a adição de peptídeos específicos, foi avaliado o papel do transportador *abcA-E* de *B. ovis* em mutante de STm sem o sistema ABC funcional.

Para assegurar que tanto STm WT como o triplo mutante para Opp/Tpp/Dpp (STm $\Delta$ 3) apresentavam atividade respiratória e metabólica iguais em cultivo *in vitro*, ambas as amostras foram comparadas quanto ao crescimento e metabolismo, utilizando método colorimétrico de tetrazólio. Após 1, 3, 4, 19 e 20 horas de incubação, STm $\Delta$ 3 apresentou redução de tetrazólio similar à amostra WT, tanto em meio mínimo M9 como em meio suplementado com aminoácidos (Figura 5). Isto demonstra que a ausência dos três sistemas ABC no mutante STm $\Delta$ 3 não prejudica seu metabolismo em meio com restrição nutricional, o que permitiu realizar o experimento seguinte utilizando peptídeos tóxicos.



**Figura 4: Crescimento *in vitro* de *Brucella ovis* e mutante  $\Delta abcAB$ .** (A) Soro fetal bovino (SFB) a 2%, 5% ou 10% foi acrescentado ao meio líquido TSB e, após 24 horas, o crescimento bacteriano foi mensurado através de leitura OD<sub>600</sub>. A adição de SFB favoreceu igualmente o crescimento *in vitro* das amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*. (B) A suplementação do meio TSB+10% SFB com níquel (NiSO<sub>4</sub> a 0,5, 1 ou 2 mM) não favoreceu crescimento do mutante  $\Delta abcAB$  após 48hs. Cátions bivalente, inclusive níquel, foram quelados com EDTA (10, 25 ou 50 mM) em meio líquido, o que limitou o crescimento de ambas as amostras. Dados representam média e erro padrão de três experimentos independentes.

Ao incubar STm WT, STm $\Delta 3$  e STm $\Delta 3$ -comp (que expressa transportador ABC de *B. ovis*) em meio mínimo com discos contendo tri-lisina ou alafosfalina em elevadas concentrações, foi estimada a letalidade para cada amostra de acordo com o diâmetro sem crescimento bacteriano medido na placa. A amostra STm WT foi susceptível à tri-lisina e à alafosfalina (Figura 6A), sendo o diâmetro de letalidade proporcional à concentração utilizada (Figura 6B). Porém, como esperado, o mutante STm $\Delta 3$  foi resistente a ambos os peptídeos tóxicos, sendo capaz de crescer em torno do disco na placa (Figura 6A). A deleção de Tpp resultou na resistência de STm à alafosfalina, o que está em concordância com os dados demonstrados anteriormente por Gibson et al. (1984), que caracterizaram isolados de STm naturalmente resistentes a este peptídeo tóxico. Além disso, acredita-se que tri-lisina

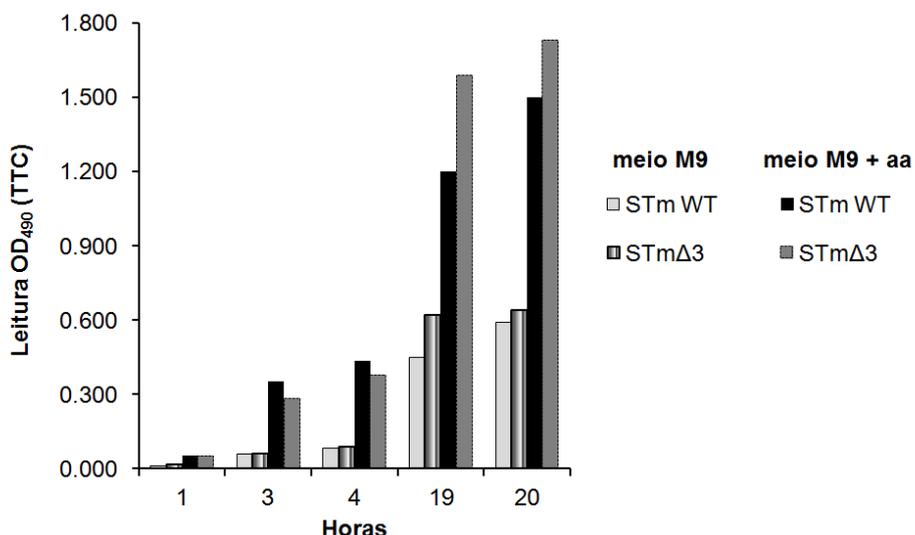
seja importada via Opp, já que amostras deficientes de Opp em *E. coli* não são capazes de utilizar este peptídeo como fonte de lisina (Naider e Becker, 1975; Andrews e Short, 1985). Assim, a resistência de STm $\Delta 3$  à tri-lisina provavelmente está associada ao transportador Opp afuncional, devido à deleção parcial dos genes *oppBC*.

Contudo, a complementação de STm $\Delta 3$  com transportador ABC de *B. ovis* não favoreceu a importação de alafosfalina ou tri-lisina, uma vez que STm $\Delta 3$ -comp manteve resistente a ambos os peptídeos (Figura 6A). Apesar do resultado negativo, os genes de *B. ovis* foram expressos em STm, já que STm $\Delta 3$ -comp expressou cauda de histidina ligada à proteína *abcA* (37k Da) durante cultivo *in vitro* em meio mínimo, como demonstrado através de *Western blot* (Figura 6C). Assim, devem ser consideradas duas possíveis justificativas: o transportador ABC

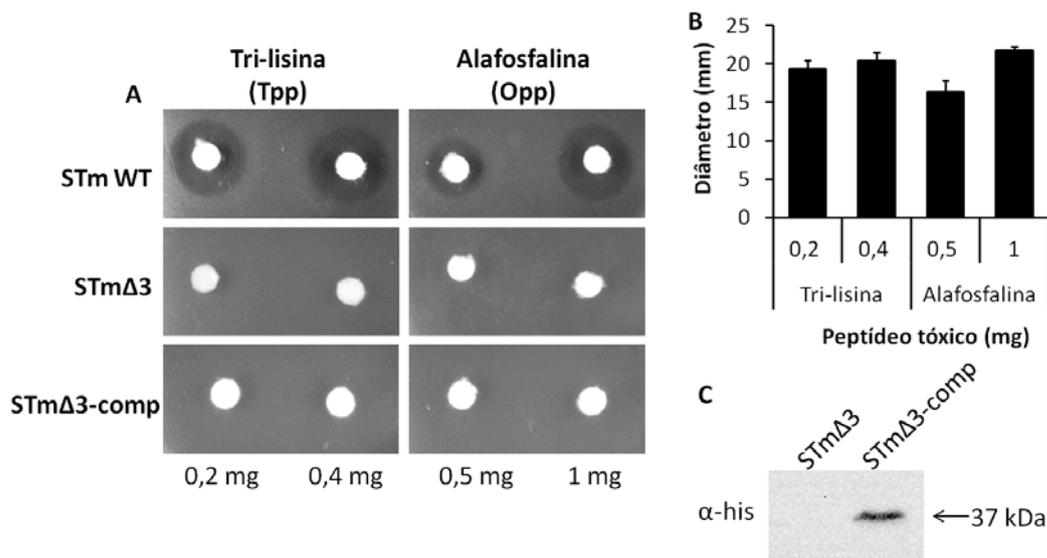
não possui função importadora similar à Opp e Tpp, podendo talvez atuar como Dpp, o qual não foi testado; ou a complementação não foi efetiva, uma vez que não se sabe se STm foi capaz de expressar na membrana um transportador funcional, conservando a estrutura quaternária das proteínas expressas em *B. ovis*.

Além disso, foi testada diretamente a ação dos peptídeos tóxicos sobre *B. ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$ , quando incubadas por 24 horas em meio líquido mínimo M9. Porém,

ambas as amostras foram resistentes à elevada concentração de alafosfalina (1 mg) e tri-lisina (0,4 mg), o que impediu avaliar, através de letalidade, a função específica do transportador ABC em *B. ovis* (dados não mostrados). A resistência de *B. ovis* contra peptídeos tóxicos pode ser parcialmente justificada por sua constituição de membrana externa naturalmente rugosa, a qual confere maior resistência contra peptídeos antimicrobianos catiônicos (Martín-Martín et al., 2011).



**Figura 5:** A deleção dos três transportadores ABC não compromete o metabolismo *in vitro* de *Salmonella Typhimurium* (STm) em meio mínimo ou suplementado com aminoácidos. STm WT e mutante STmΔ3 sem os três principais transportadores ABC (Opp/Dpp/Tpp) foram incubados a 37 °C em placa de 96 poços com meio mínimo M9 com cloreto de tetrazólio (TTC), suplementado ou não com 80 mM de aminoácidos (aa). Gráfico representa um experimento.



**Figura 6: O transportador ABC codificado por *abcA-E* de *Brucella ovis* não é capaz de importar peptídeos tóxicos em *Salmonella Typhimurium* LT2** (A) As amostras *S. Typhimurium* (STm WT), triplo mutante para transportadores ABC (STmΔ3) e mutante complementado com transportador *abcA-E* de *B. ovis* (STmΔ3-comp) foram cultivadas em meio mínimo contendo disco com tri-lisina (0,2 mg e 0,4 mg) ou alafosfalina (0,5 mg e 1 mg). Ambos STmΔ3 e STmΔ3-comp foram resistentes aos peptídeos tóxicos, enquanto STm WT foi susceptível. Figura é representativa de três experimentos independentes. (B) Susceptibilidade de STm WT aos peptídeos tóxicos foi mensurada (mm) entorno do disco. Dados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. (C) *Western blot* anti-histidina ( $\alpha$ -his) em STmΔ3-comp durante crescimento *in vitro*. A cauda de histidina presente na extremidade C-terminal da proteína *abcA* (~37 kDa) confirma a expressão do transportador ABC em STm.

### 5.5. O transportador ABC específico de *Brucella ovis* é necessário para a sua multiplicação intracelular em células epiteliais HeLa

*Brucella* spp. é um patógeno intracelular capaz de multiplicar em células fagocíticas profissionais e não fagocíticas, inclusive em linhagens celulares de origem epitelial (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Starr et al., 2008). Considerando que células HeLa, linhagem epitelial imortalizada humana, permitem avaliar a cinética de infecção e o tráfego intracelular de *Brucella* spp., estas foram utilizadas para comparar as amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*.

A infecção *in vitro* de células HeLa demonstrou que amostra WT e mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* apresentam internalização e cinética similares até 8

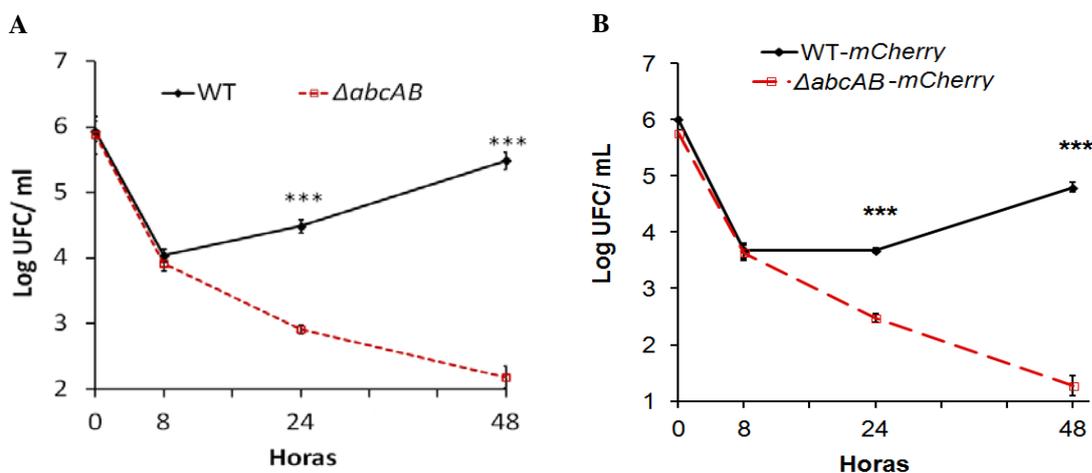
horas pós-infecção (hpi). Porém, o mutante  $\Delta abcAB$  apresentou baixos valores de UFC ( $p < 0,001$ ) após 24 horas, sendo a infecção controlada até 48 hpi. Ao contrário, *B. ovis* WT foi capaz de sobreviver e multiplicar em células HeLa 48 hpi (Figura 7A). Sabe-se que linhagens epiteliais não possuem potencial bactericida como macrófagos (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Starr et al., 2008), o que permite avaliar alguns mutantes que são rapidamente controlados em células fagocíticas profissionais. Como o mutante  $\Delta abcAB$  apresentou cinética de infecção semelhante à previamente descrita em macrófagos (Silva et al., 2011), isto reafirmou que o transportador ABC possui papel crucial na sobrevivência intracelular de *B. ovis*, inclusive em células epiteliais.

Além disso, a deleção do transportador ABC possivelmente não interfere na internalização de *B. ovis* em células HeLa,

uma vez que não houve diferença nos valores recuperados de WT e  $\Delta abcAB$  no início da infecção (Figura 7A). Isto sugere que o principal papel deste sistema ABC ocorre durante a fase mais tardia da infecção (a partir de 24 hpi), fase em que a *Brucella* spp. alcança o nicho de multiplicação celular (Pizarro-Cerdá et al., 2000; Starr et al., 2008). Assim, é importante avaliar o tráfego intracelular de *B. ovis*  $\Delta abcAB$  para compreender a distinta cinética de infecção observada após 24 horas de infecção.

Para avaliar o tráfego intracelular de *B. ovis*, primeiramente, a fluorescência *mCherry* foi inserida no cromossomo de WT e  $\Delta abcAB$ , sendo as amostras construídas denominadas

WT-*mCherry* e  $\Delta abcAB$ -*mCherry*, respectivamente. A expressão constitutiva de *mCherry* foi confirmada através da fluorescência vermelha observada em ambas as amostras através da microscopia fluorescente. Para confirmar que a expressão de *mCherry* não interferiu na patogenicidade da *B. ovis*, a infecção *in vitro* de células HeLa foi repetida utilizando WT-*mCherry* e  $\Delta abcAB$ -*mCherry*, sendo a cinética de infecção comparada às amostras WT e  $\Delta abcAB$ . Tanto WT-*mCherry* como  $\Delta abcAB$ -*mCherry* apresentaram cinética de infecção em células HeLa idêntica à descrita anteriormente (Figura 7B), o que permitiu utilizar estes mutantes para a microscopia confocal.



**Figura 7: Sobrevivência intracelular de *Brucella ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$  em linhagem de células epiteliais HeLa.** Células HeLa foram infectadas com MOI 1:1000 de *B. ovis* WT ou  $\Delta abcAB$  (A) ou por mesmas amostras com expressão de fluorescência *mCherry* (B). As amostras foram avaliadas quanto à sobrevivência intracelular após 0, 8, 24 e 48 horas de infecção (hpi). *B. ovis* WT foi capaz de multiplicar em células HeLa até 48 hpi, enquanto mutante  $\Delta abcAB$  não sobreviveu intracelularmente. Dados representam média geométrica e erro padrão de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$  está indicada por asteriscos (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

### 5.6. O mutante $\Delta abcAB$ de *Brucella ovis* não é capaz de evadir da fusão fagolisossomo

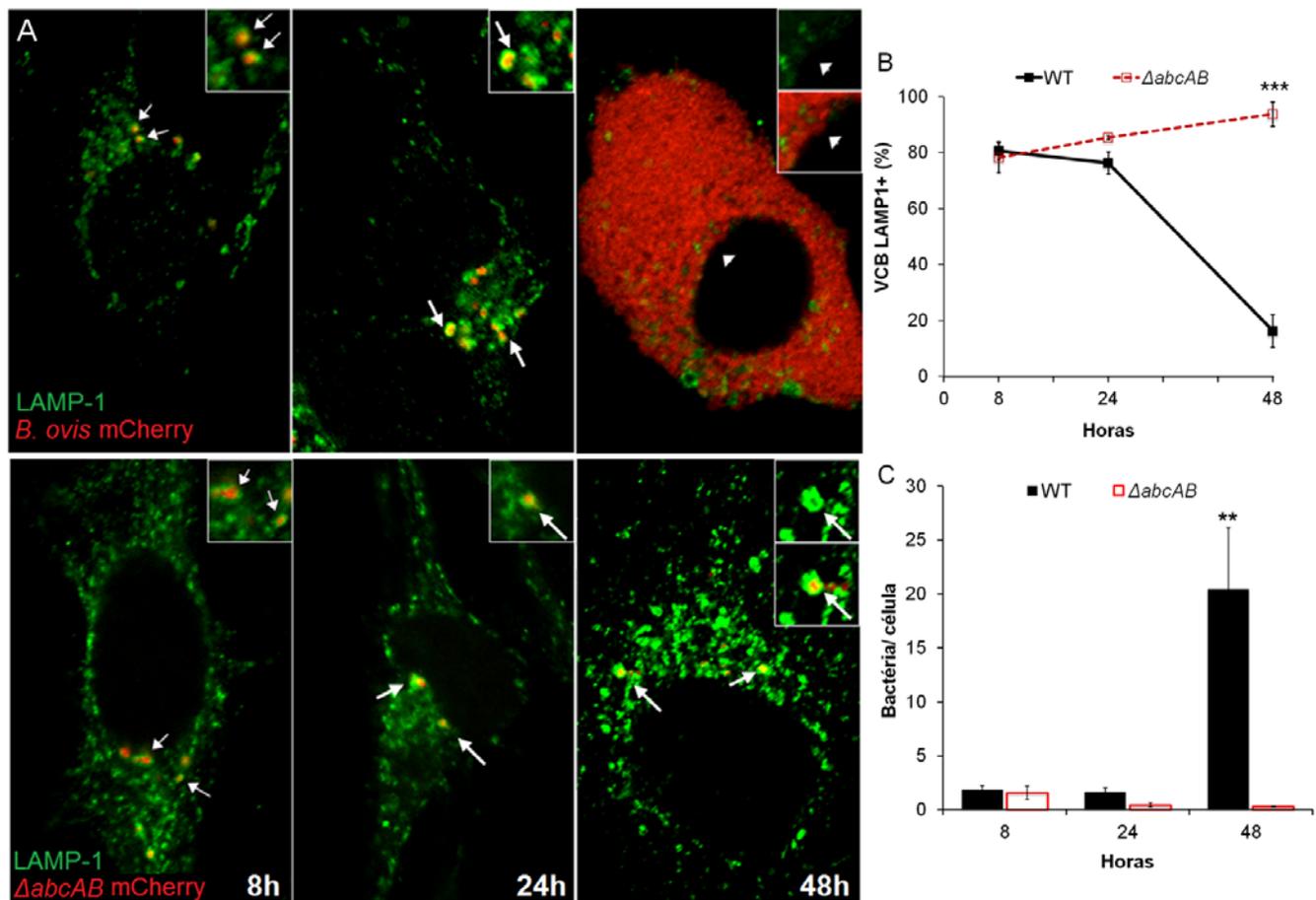
O tráfego em células fagocíticas e não fagocíticas foi detalhadamente descrito para espécies clássicas lisas de *Brucella* spp., como *B. abortus* (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Starr et al., 2008; Starr et al., 2012). Contudo, há escassos trabalhos que descrevem espécies naturalmente rugosas, sendo interessante caracterizar o tráfego intracelular de *B. ovis* através de microscopia confocal e compará-lo com o mutante  $\Delta abcAB$ . Apesar de células HeLa serem uma linhagem humana, estas tem sido amplamente utilizadas como modelo padrão para a caracterização do tráfego intracelular em *Brucella* spp, sendo, portanto, utilizadas para *B. ovis*.

Através da microscopia confocal, as amostras WT-*mCherry* e  $\Delta abcAB$ -*mCherry* apresentaram tráfego intracelular similar com 8 e 24 hpi em células HeLa. Nesta fase, a maioria de *Brucella* expressando *mCherry* apresentou-se colocalizada com compartimentos positivos para LAMP-1, um marcador utilizado para lisossomo (Figura 8A). Após 48 horas de infecção, maior quantidade de *Brucella*-*mCherry* foi observada em células HeLa infectadas com amostra WT, porém, estas foram capazes de escapar do compartimento LAMP-1 positivo (~80%) (Figura 8B). No entanto, baixa quantidade de mutante  $\Delta abcAB$ -*mCherry* foi observado em células HeLa com 48 hpi (Figuras 8A e 8C), sendo que quase 90% das bactérias colocalizavam com compartimento positivo para LAMP-1 (Figura 8B). Estes resultados demonstram que *B. ovis* WT é capaz de evitar a fusão com o lisossomo, multiplicando em estágio tardio da infecção (48 horas). Enquanto isso, o mutante  $\Delta abcAB$  não escapa do lisossomo, não sendo capaz de sobreviver em células HeLa.

*B. ovis* apresentou tráfego intracelular similar ao descrito para espécies lisas de

*Brucella* spp. (Celli et al., 2003; Star et al., 2008). Apesar de ser uma espécie rugosa sem potencial patogênico para o homem, foi demonstrado que *B. ovis* é capaz de estabelecer infecção e multiplicar efetivamente em células epiteliais HeLa. Estudos prévios relatam que o número de bactéria por célula HeLa é frequentemente baixo e variável durante a infecção por *Brucella* spp. (Detilleux et al., 1990; Pizarro-Cerdá et al., 1998a). Neste trabalho foi observado que tanto *B. ovis* WT como o mutante  $\Delta abcAB$  apresentam baixos valores de VCB após 8 e 24 horas de infecção (Figura 8C), apesar de ter sido utilizado elevado MOI (1:1000). Além disso, algumas células infectadas por *B. ovis* WT apresentaram intensa multiplicação com 48 hpi (Figura 8A, painel superior), enquanto outras células não (25,4%), o que justifica a grande variação observada na contagem de bactérias por célula neste tempo de infecção (Figura 8C). Estes dados reafirmam que nem todas as células cultivadas são igualmente susceptíveis à multiplicação intracelular de *Brucella* spp., como descrito anteriormente por Sola-Landa et al. (1998).

Sabe-se que a interação lisossomal temporária durante o tráfego intracelular resulta na acidificação e maturação do VCB, sendo estes processos essenciais para a sobrevivência de *Brucella* spp., uma vez que induzem a expressão de fatores de patogenicidade, como o SST4 (Porte et al., 1999; Celli et al., 2003). A infecção e o tráfego intracelular do mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* em células HeLa foram semelhantes ao observados com mutantes *virB* de *Brucella* spp., que possuem o SST4 afuncional, não sendo capaz de escapar da fusão fagolisossomo (Gorvel e Moreno 2002; Celli et al., 2003, Starr et al., 2008). Exclusivamente em *B. ovis*, o SST4 possui um importante papel tanto na persistência da infecção como para o estabelecimento inicial da infecção no camundongo e em macrófagos (Sá et al., 2012). Em espécies



**Figura 8: Transportador ABC permite que *Brucella ovis* escape da fusão fagolisossomal e sobreviva intracelularmente em células HeLa.** (A) Ilustração representativa do tráfego intracelular por microscopia confocal de *B. ovis* WT (painel superior) e mutante  $\Delta abcAB$  (painel inferior) que expressam *mCherry* (vermelho) durante a infecção de células HeLa. *B. ovis*  $\Delta abcAB$  colocaliza com compartimento positivo para LAMP-1 (verde) até 48 horas, não sendo capaz de sobreviver. No entanto, *B. ovis* WT é capaz de escapar do lisossomo e multiplicar até 48 horas. (B) Média percentual de vacúolo contendo *Brucella* (VCB) que são positivos para LAMP-1 durante a infecção por WT (coluna preta) ou  $\Delta abcAB$  (linha vermelha) de *B. ovis*. (C) Média do número de bactérias por célula contadas (total 100 células por tempo) durante o curso da infecção. Dados representam media e desvio padrão de pelo menos 100 células de três experimentos independentes. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

lisas, contudo, a deleção do SST4 não interfere na infecção inicial em modelo murino, conservando fenótipo similar às amostras WT até cinco dias pós-infecção (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; Rolan e Tsolis, 2007; Sá et al., 2012). Em concordância com os resultados de microscopia confocal, trabalhos prévios demonstraram que os mutantes  $\Delta abcAB$  e  $\Delta virB2$  de *B. ovis* possuem fenótipos similares em macrófagos e em camundongos (Silva et al., 2011; Sá et al., 2012). Considerando que o SST4 é um dos principais fatores de virulência para a sobrevivência e multiplicação intracelular de *Brucella* spp. (Celli et al., 2003; Starr et al., 2008), foi analisado a expressão de proteínas VirB durante o crescimento *in vitro* de *B. ovis*  $\Delta abcAB$ .

#### **5.7.O transportador ABC de *Brucella ovis* interfere na expressão do sistema de secreção tipo IV**

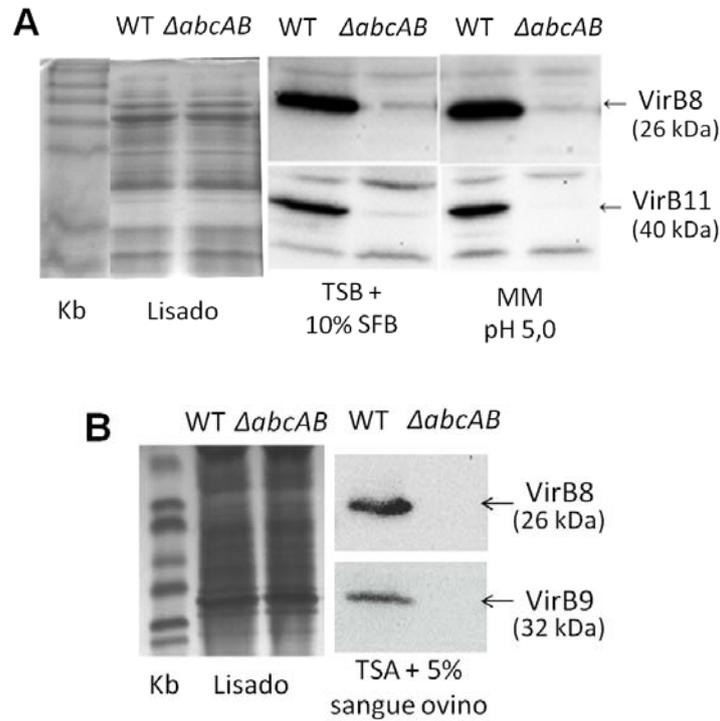
O SST4 altera a maturação do vacúolo contendo *Brucella* spp. e inibe a sua fusão com o lisossomo, permitindo que o organismo alcance o retículo endoplasmático e se replique intracelularmente (Sieira et al., 2000; Celli et al., 2003). Uma vez que o mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* perdeu a habilidade de evadir do lisossomo, foi analisada a expressão *in vitro* de proteínas VirB através de *Western blot*. Para mimetizar a condição intracelular que induz a máxima expressão do SST4 (Boschiroli et al., 2002; Sieira et al., 2004), as amostras WT e  $\Delta abcAB$  também foram analisadas em meio mínimo ácido.

No *Western blot*, foi observado que *B. ovis* expressa proteínas VirB8 (26 kDa) e VirB11 (40 kDa) tanto no meio rico TSB com SFB, como no meio mínimo E com pH 5,0 (Figura 9A). Adicionalmente, *B. ovis* também é capaz de expressar proteínas do SST4, como VirB8 e VirB9 (32 kDa),

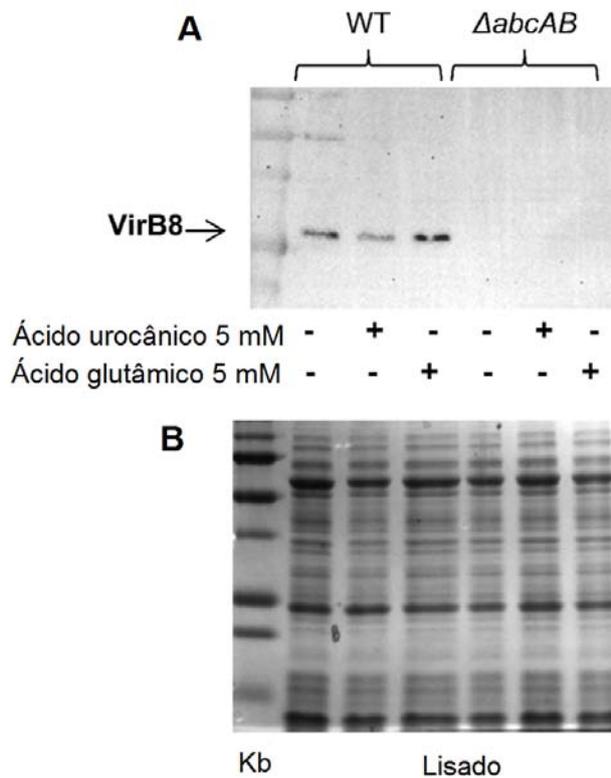
durante o crescimento em placa com meio rico TSA com 5% de sangue ovino (Figura 9B). Contudo, o mutante  $\Delta abcAB$  apresentou fraca expressão de proteínas VirB durante o crescimento *in vitro* em todos os meios, inclusive após ser transferido para meio mínimo ácido (Figura 9A-B). Este resultado está em concordância com o tráfego intracelular observado em células HeLa através da microscopia confocal. Portanto, o transportador ABC em *B. ovis* possivelmente interfere na expressão do SST4, sendo este essencial para a sua sobrevivência intracelular. Além disso, já foi descrito que a expressão do SST4 em *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis* é induzida por baixo pH e estresse nutricional, o que se assemelha ao vacúolo durante a fase inicial (8 hpi) do tráfego intracelular (Boschiroli et al., 2002; Rouot et al., 2003; de Jong et al., 2008). *B. ovis* difere das demais espécies de *Brucella*, uma vez que a expressão de proteínas VirB foi independente do pH do meio.

A transcrição *in vitro* do SST4 em *Brucella* spp. pode ser favorecida pela adição de ácido urocânico ao meio mínimo, uma vez que a bactéria o utiliza na via catabólica de histidina, resultando no aumento da expressão das proteínas reguladoras HutC e VjbR, que ativam a expressão de proteínas VirB (Sieira et al., 2010; Arocena et al., 2012). Assim, foi testada se o mutante  $\Delta abcAB$  seria capaz de expressar SST4 com a indução de duas vias regulatórias na presença de ácido urocânico.

O mutante  $\Delta abcAB$  não foi capaz de expressar proteínas codificadas pelo SST4 (como VirB8), mesmo com a adição a 5 mM de ácido urocânico ao meio ácido (Figura 10A). Apesar de a concentração proteica ter sido semelhante entre todas as amostras (Figura 10B), somente *B. ovis* WT manteve a expressão de VirB após ser transferido para o meio mínimo E pH 5,0 (MM) com ácido urocânico (Figura 10A).



**Figura 9: Transportador *abcA-E* é necessário para a expressão de proteínas do sistema de secreção tipo IV (SST4) em *Brucella ovis*.** (A) *Western blot* de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  cultivadas em meio líquido rico (coluna esquerda) e transferidas para meio mínimo ácido (coluna direita). Proteínas VirB8 (painel superior) e VirB11 (painel inferior) foram expressas intensamente somente na amostra WT em ambos os meios, sendo a expressão de SST4 independente de baixo pH em *B. ovis*. Mutante  $\Delta abcAB$  apresenta fraca expressão de proteínas VirB, inclusive em meio mínimo ácido. (B) *Western blot* anti-VirB8 e anti-VirB9 de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  cultivadas em placa contendo meio rico TSA com 5% de sangue ovino. Colunas à esquerda demonstram concentração proteica similar das amostras lisadas. Figura de um experimento representativo de três experimentos independentes.



**Figura 10: A adição de ácido urocânico ao meio mínimo ácido não induz a expressão do SST4 no mutante  $\Delta abcAB$  de *Brucella ovis*.** (A) *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  foram transferidas para meio mínimo E com pH 5,0, suplementado ou não com ácido urocânico ou ácido glutâmico (controle interno). Após 4 horas de incubação, a expressão *in vitro* de VirB8 (26 kDa) foi avaliada por *Western blot*. (B) Eletroforese de cada amostra (5  $\mu$ L) em gel SDS-PAGE a 12% e corada por *Coomassie Brilliant Blue*, para confirmar a concentração proteica. Figura representativa de três experimentos independentes.

### 5.8.A regulação do SST4 via transportador ABC é a nível pós-transcricional

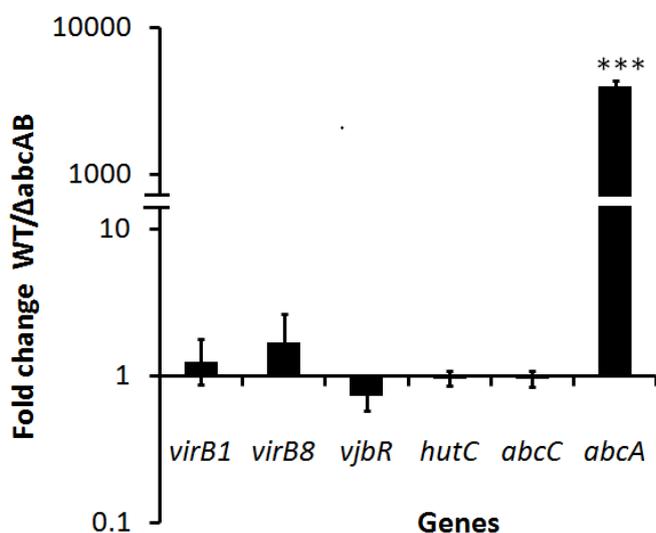
Para avaliar se a fraca expressão do SST4 no mutante foi devido à alteração de transcrição ou se pós-transcricional, foi analisada a presença de RNA mensageiro (RNAm) de *virB* e de dois reguladores de transcrição do SST4 (*vjbR* e *hutC*) em WT e  $\Delta abcAB$  durante o crescimento *in vitro* em meio líquido rico. Os níveis de RNAm de *virB1*, *virB8* e dos reguladores *vjbR* e *hutC* foram similares entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$ . Este resultado demonstrou que o transportador ABC de *B. ovis* não interfere na transcrição dos genes do SST4, nem na transcrição de dois importantes reguladores (Figura 11). Estudos anteriores

demonstraram que HutC possui importante papel na ativação do SST4 em meio ácido com restrição nutricional, mas não em meio neutro (Sieira et al., 2010; Arocena et al., 2012). Possivelmente, o crescimento exponencial de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  em meio rico neutro favoreceu a ativação da via metabólica de utilização de histidina em ambas as amostras, o que poderia justificar a transcrição similar do regulador *hutC*. Adicionalmente, sabe-se que VjbR é o principal regulador transcricional do SST4, ativando diretamente a expressão das proteínas VirB, através do sítio de ligação presente na região promotora mais próximo ao locus *virB* (de Jong et al., 2008; Arocena et al., 2010). Vários estudos têm demonstrado que a ausência da proteína VjbR está intimamente relacionada à baixa

transcrição e expressão de *virB* (Delrue et al., 2005; Uzureau et al., 2010; Weeks et al., 2010). Apesar do mutante  $\Delta abcAB$  apresentar baixa expressão de proteínas VirB (Figura 9), esta não foi justificada pelo nível de transcrição de *vjbR* ou de *virB* (Figura 11). Em concordância com estes dados, Arocena et al. (2010) demonstraram em *B. abortus* que a proteína VbjR pode ser regulada a nível pós-transcricional durante crescimento *in vitro*, uma vez que amostras com condição nutricional variada apresentam concentração similar de RNAm, porém, diferente expressão proteica observada por *Western blot*. Portanto, os resultados de tempo real e *Western blot* indicam que a regulação da expressão do SST4 via transportador ABC em *B. ovis* pode ser pós-transcricional, sendo

importante analisar o perfil proteico das amostras.

Adicionalmente, foi avaliado se a deleção pontual de genes do transportador ABC comprometeu a transcrição de outros genes do mesmo locus. Como esperado, a amostra WT de *B. ovis* apresentou elevados níveis de *abcA* (BOV\_A0500) do que o mutante  $\Delta abcAB$ , sendo valor de  $p=0,00035$  (Figura 11). Porém, a transcrição de *abcC* (BOV\_A0503), que está anterior à região deletada, foi similar entre ambas as amostras. Assim, estes dados evidenciaram que a mutagênese em  $\Delta abcAB$  afetou somente a transcrição dos dois genes deletados do transportador ABC, não comprometendo a transcrição parcial do locus *abcA-E* em *B. ovis*.



**Figura 11:** A regulação do sistema de secreção tipo IV (SST4) via transportador ABC em *Brucella ovis* é a nível pós-transcricional. Níveis de RNA mensageiro de *virB1*, *virB8*, *vjbR* e *hutC* foram mensurados por RT-PCR em tempo real, após crescimento *in vitro* de *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  em meio líquido rico (TSB +10% SFB). Para confirmar a deleção pontual no mutante  $\Delta abcAB$ , a transcrição dos genes *abcA* e *abcC* foi analisada. Dados representam média geométrica e erro padrão dos valores de Ct de WT em relação ao mutante  $\Delta abcAB$  de três experimentos independentes. \*\*\* $p=0,00035$ .

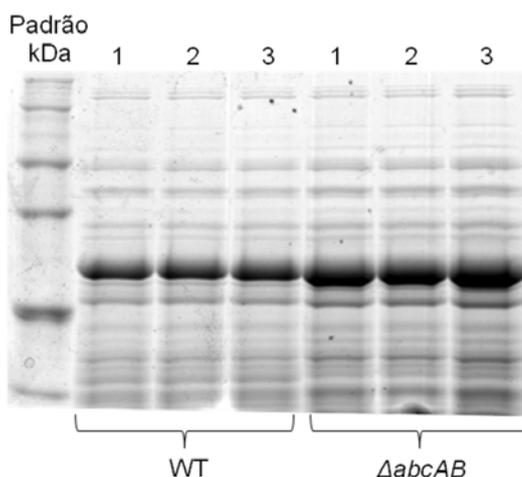
### 5.9. Reprodutibilidade do perfil proteico de *Brucella ovis* cultivada *in vitro*

Considerando que a ausência de um único transportador ABC em *B. ovis* prejudica a expressão de SST4 e que o mecanismo de regulação entre os dois fatores é pós-transcricional, foi realizado a análise proteômica comparativa entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$ .

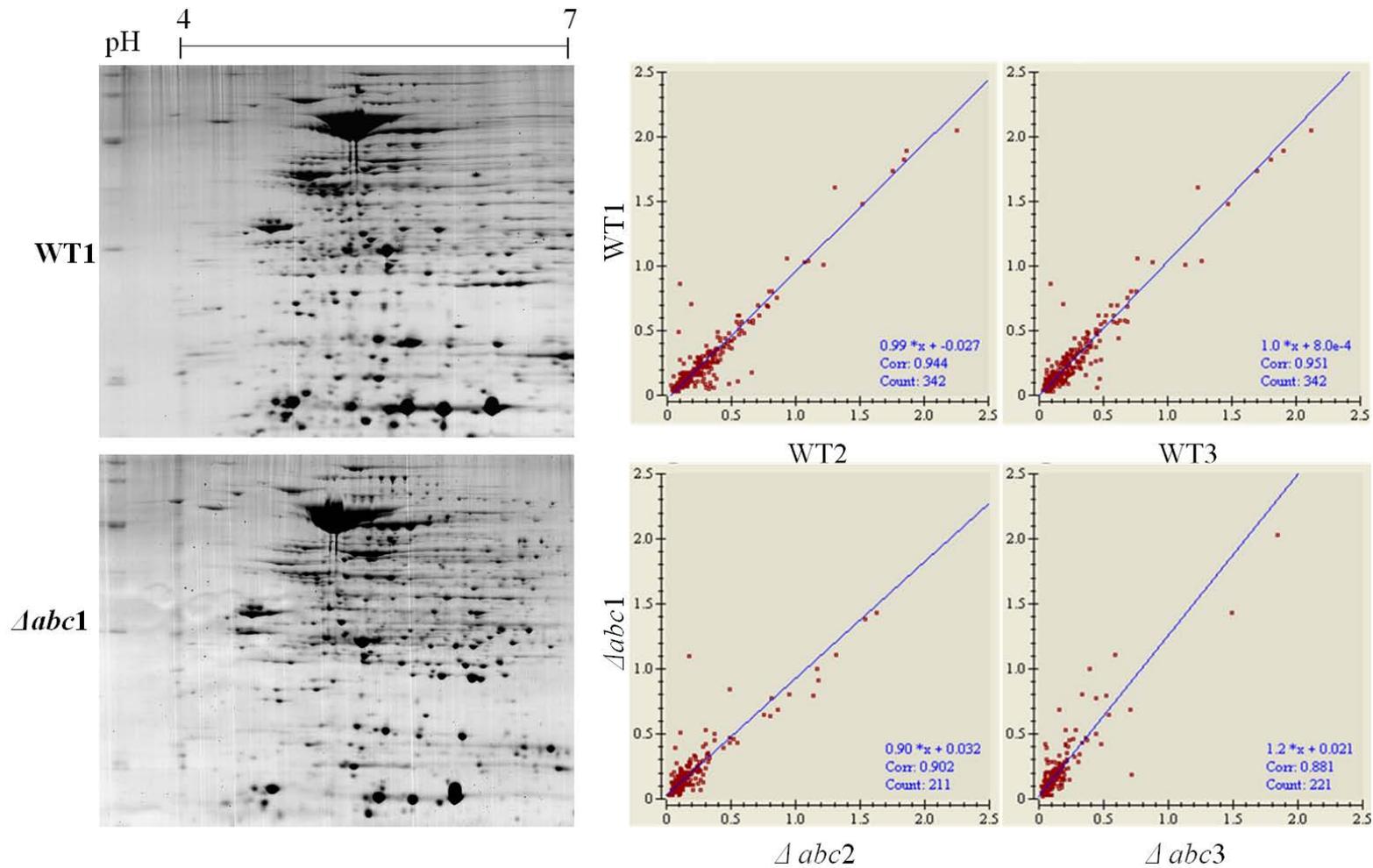
Inicialmente, ambas as amostras foram cultivadas em meio rico TSA com 10% hemoglobina nas mesmas condições, para avaliar a qualidade da extração e a dosagem proteica das triplicatas. Todas as seis amostras apresentaram boa concentração (8-18  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), avaliada pelo kit 2D Quant, e boa qualidade de proteínas extraídas, que foi confirmada pela eletroforese em gel 1D SDS-PAGE a 12% (Figura 12).

Em seguida, foi avaliado o perfil proteico das triplicatas de WT e  $\Delta abcAB$ . O perfil proteico foi similar entre as duas amostras (Figura 13A) o que permitiu a marcação de *spots* comuns como pontos de referência,

denominados *landmarks*. Estes *spots* estavam presentes em todas as imagens que foram comparadas, sendo utilizadas para calcular através do *software* DeCyder 2D as localizações correspondentes entre os quatro géis. Para avaliar a reprodutibilidade dos géis de *B. ovis* e  $\Delta abcAB$ , o número e a intensidade de *spots* comuns detectados entre as triplicatas foram analisados com a construção de gráficos de dispersão (Figura 13B). A reprodutibilidade é considerada aceitável quando apresenta valor de correlação maior do que 0,75. As correlações entre as triplicatas de  $\Delta abcAB$  foram maiores do que 0,88 e, entre as triplicatas de *B. ovis* WT, estas foram maiores do que 0,94 (Figura 13B). Estes resultados indicam que houve uma variação experimental mínima relacionada à quantidade de proteína e corante utilizadas (Görg et al., 2004). Assim, o diagrama de dispersão evidenciou que a intensidade de *spots* e o perfil proteico são semelhantes entre os géis das triplicatas (Figura 13), o que permitiu a utilização de uma mistura das três amostras para a análise comparativa através de DIGE.



**Figura 12: Avaliação da qualidade proteica de *Brucella ovis* WT e  $\Delta abcAB$  cultivadas *in vitro* através de SDS-PAGE.** Três amostras independentes de *B. ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$  foram cultivadas por três dias em meio rico TSA com 10% de hemoglobina, seguida de extração proteica. Eletrofores das amostras proteicas (1,5  $\mu\text{L}$  cada) em gel SDS-PAGE a 12% e coradas por *Coomassie Brilliant Blue*. A qualidade e padrão proteico foram similares entre todas as amostras analisadas.



**Figura 13: Perfil proteico e diagrama de dispersão da intensidade dos spots entre as triplicatas de WT (painel superior) e de  $\Delta abcAB$  (painel inferior) de *Brucella ovis* durante crescimento *in vitro*. A) Géis 2D de SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue* demonstram o perfil proteico de *B. ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$  em gel *Master* (amostras WT1 e abc1), utilizando tiras IPG de 18 cm, pH 4 a 7. (B) Comparação da intensidade dos spots obtidas entre o gel *Master* e as triplicatas de WT (painel superior) e de  $\Delta abcAB$  (painel inferior) através do programa *ImageMaster™ 2D Platinum*. Correlação: WT1 e WT2= 0,944; WT1 e WT3= 0,951;  $\Delta abc1$  e  $\Delta abc2$ = 0,902;  $\Delta abc1$  e  $\Delta abc3$ = 0,881.**

### 5.10. *Brucella ovis* $\Delta abcAB$ apresenta diferenças qualitativas e quantitativas de volume de *spots* em eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE)

Para avaliar a diferença proteica entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*, uma mistura com concentrações iguais de cada triplicata foi preparado antes de fazer a mistura final entre as amostras para cada gel, como demonstrado na Tabela 4. Quatro géis fluorescentes foram confeccionados para a análise estatística, sendo ilustrada na Figura 14 a imagem obtida com o escaneamento de um gel. Inicialmente, a sobreposição das imagens de WT e  $\Delta abcAB$  permitiu visualizar *spots* com diferenças qualitativas de expressão, sendo que a maioria estava ausente no mutante  $\Delta abcAB$  (Figura 14).

As imagens fluorescentes obtidas com cada corante foram copiladas e analisadas pelo programa DeCyder 2D (GE Healthcare, Suécia), através da detecção inicial automática de 2500 *spots* presentes em cada gel. Artefatos foram removidos através da exclusão de *spots* com inclinação menor que 2,0 e área inferior a 450. Pontos inespecíficos com elevada inclinação, denominados *spikes*, foram manualmente excluídos de todos os géis. Em seguida, foi avaliada a possibilidade de detectar *spots* com diferente intensidade na escala de cinza, através do cálculo da variação de magnitude em cada imagem digital, denominado *dynamic range* (DR). Em análises intergéis, é necessário estimar a variação de magnitude para verificar se é confiável a comparação entre as imagens obtidas. O DR foi calculado em cada gel pela diferença entre *spot* com maior volume e *spot* com menor volume em valores logarítmicos. Géis analisados pelo DeCyder 2-D com valores de DR > 5 não são consideradas confiáveis. Todos os quatro géis apresentaram variação menor do que 5 (valores DR gel 1= 4,32; gel 2= 4,39; gel 3= 4,72; gel 4= 4,59), o que permitiu a análise quantitativa confiável

entre *spots* correspondentes na análise intergéis.

Considerando a presença de dois grupos experimentais (WT e  $\Delta abcAB$ ), após a identificação de *spots* idênticos entre géis, foram selecionados *spots* com diferença significativa de expressão entre as duas amostras ( $p < 0,05$ ) e com limiar de diferença de expressão (ou *threshold*) maior que 1,5. Através de análise por DIGE, foram observados 100 *spots* diferentemente expressos entre as amostras (Figura 15). Através do programa DeCyder no modo *Extended Data Analysis*, um mapa proteico (*heat map*) foi elaborado para comparar a média de expressão de cada *spot* entre *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$ . A maioria dos *spots* apresentaram menor expressão no mutante  $\Delta abcAB$ , como visualizado na Figura 15A. Adicionalmente, através da análise de componentes principais (PCA), foram observados seis *spots outliers* do conjunto de dados (Figura 15B), sendo individualmente confirmados que esta discrepância era devido à grande diferença de expressão entre as amostras. Os *spots outliers* apresentavam a razão da intensidade de pico variando entre +3,66 e -36,03 ao comparar  $\Delta abcAB$  em relação à amostra WT. Além disso, os perfis de *spots* foram similares em PCA ao agruparem tanto entre as amostras de WT como entre as de  $\Delta abcAB$  (Figura 15C), apesar da utilização de dois corantes (Cy3 e Cy5) em cada grupo experimental. Isto reafirmou que a diferença de expressão observada entre *B. ovis* WT e  $\Delta abcAB$  nos quatro géis não foi resultante da diferente intensidade de fluorescência entre os corantes selecionados, mas sim, devido à diferença no perfil proteico.

Dos 100 *spots* diferentemente expressos, 78 foram visualizados e extraídos de dois géis fluorescentes posteriormente corados por *Coomassie Brilliant Blue* (Figura 16), seguida de identificação por espectrometria de massa (MS). A Figura 16 demonstra a localização em gel 2D e enumeração de

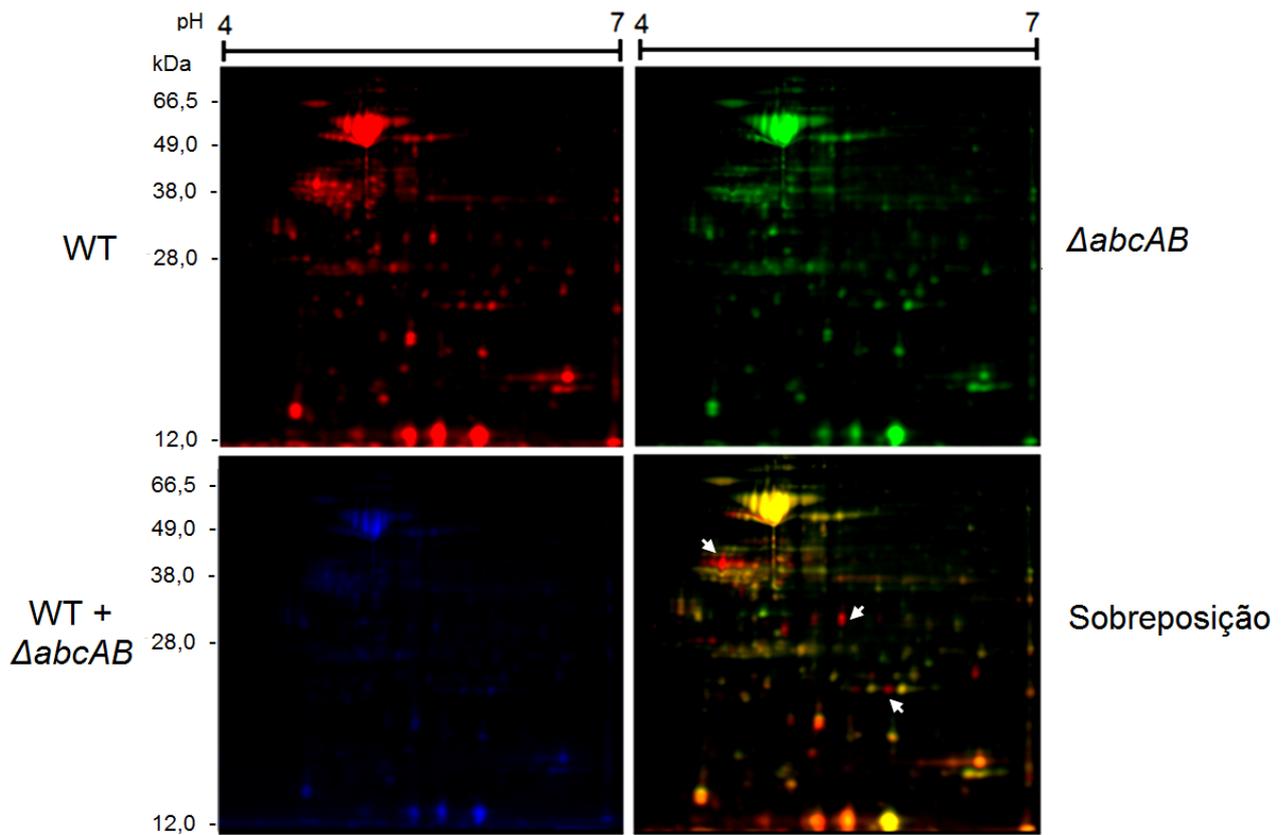
*spots* extraídos da amostra WT (quando expressão diminuída ou ausente em  $\Delta abcAB$ ) e da amostra  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* (quando expressão aumentada).

Dentre os 78 *spots*, 55 (70,5%) foram identificados por MALDI TOF/TOF, sendo 40 diminuídos de expressão em  $\Delta abcAB$  (Tabela S1) e 15 aumentados em  $\Delta abcAB$  (Tabela S2). Porém, 23 *spots* de proteína não foram identificados por MS ou MS/MS (Tabela S3). As Tabelas S1 e S2 demonstram o número de *spot* identificado, o gene de *B. ovis* que codifica a proteína, a função proteica predita, massa molecular e ponto isoelétrico preditos e experimentais, as sequências de peptídeos reconhecidas em cada *spot*, além do score e percentagem de cobertura obtidos através do programa MASCOT.

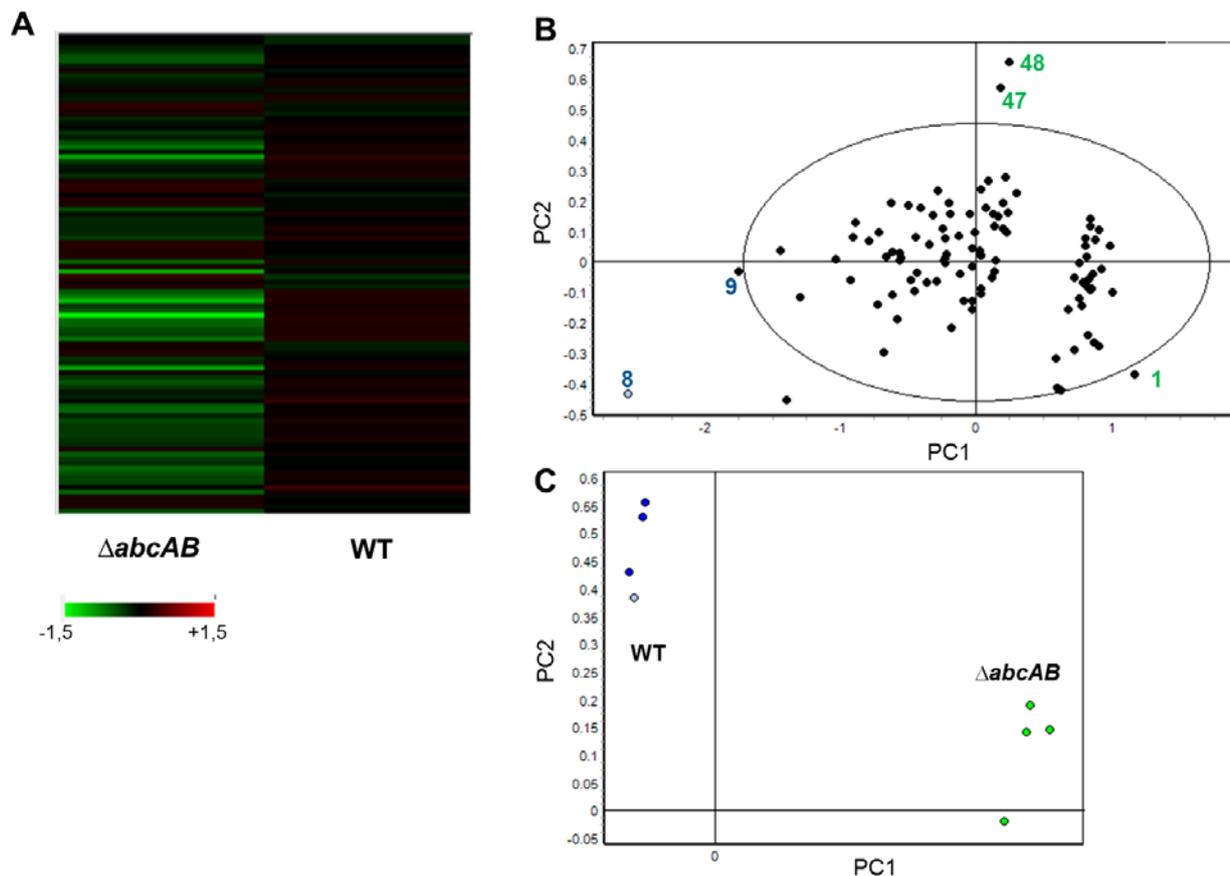
Quatro proteínas (representadas por nove *spots*) com expressão diminuída em *B. ovis*  $\Delta abcAB$  não foram identificadas no banco de dados de *B. ovis* em NCBI. Contudo, estas sequências de peptídeos, reconhecidas como proteínas periplasmáticas ligadoras de substrato de sistemas ABC, estão conservadas em várias espécies clássicas de *Brucella* spp. Assim, neste caso, foi

utilizado o banco de dados de *B. melitensis* 16M como referência (Tabela 5 e S1). Ao realizar BLASTn da sequência de nucleotídeos entre *B. melitensis* 16M e *B. ovis* ATCC25840 através de NCBI, todas as sequências de *B. ovis* alinhadas (identidade > 98%) foram identificadas como pseudogenes. Estes resultados evidenciam que as anotações genômicas computacionais de *B. ovis* precisam ser revisadas, uma vez que sequências consideradas pseudogenes são expressas e potencialmente funcionais durante o cultivo *in vitro*. Lamontagne et al. (2010) também evidenciaram erros de anotação no genoma de *B. abortus* após a análise proteômica, no qual identificaram a expressão de quatro proteínas codificadas por cinco ORFs considerados pseudogenes.

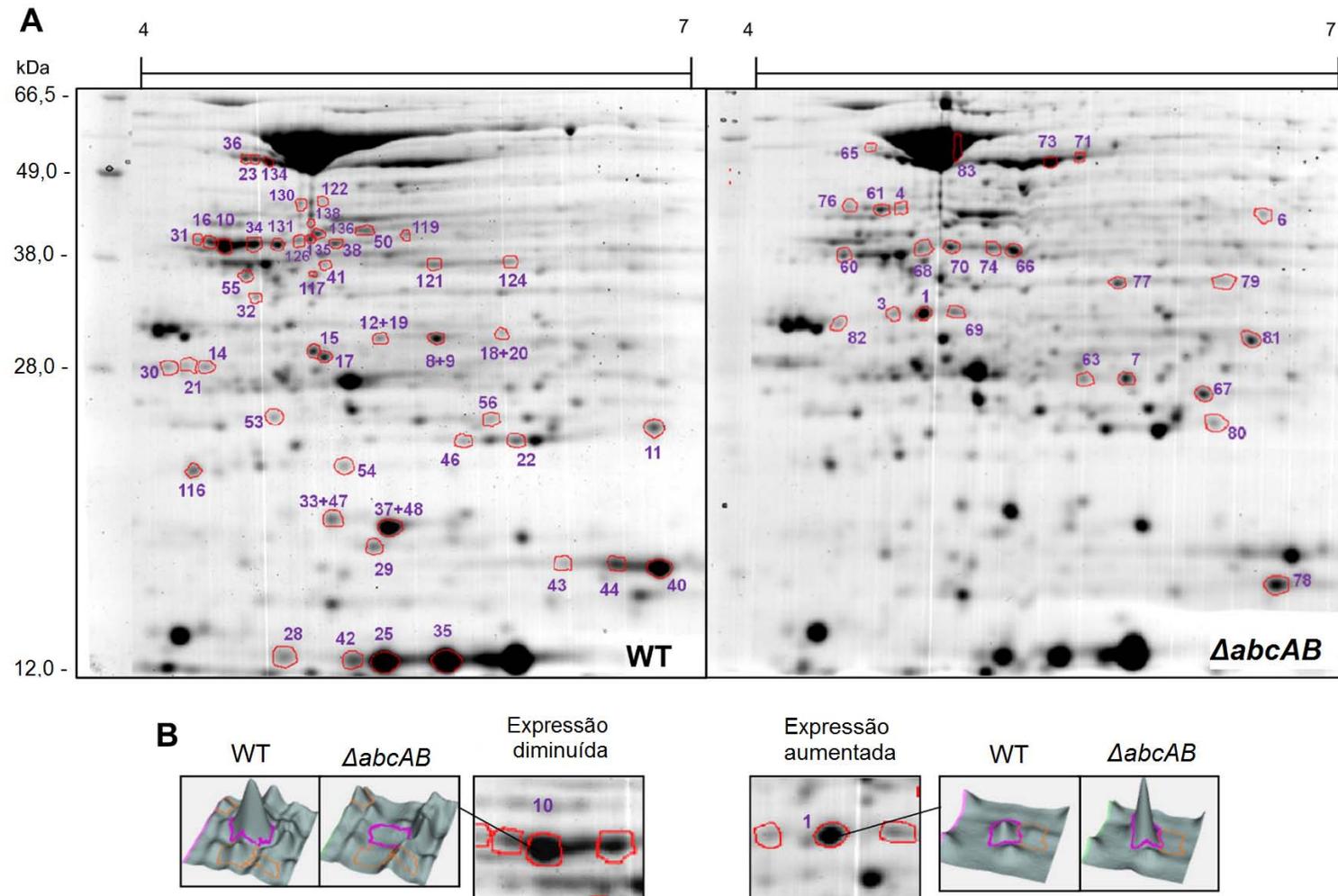
As proteínas identificadas que apresentaram expressão diminuída (Tabela 5) ou aumentada (Tabela 6) em  $\Delta abcAB$  quando comparada com *B. ovis* WT, foram classificadas em grupos funcionais através de *Uniprot*. Este é o primeiro trabalho que caracteriza perfil proteômico de *B. ovis* através da identificação precisa de um maior número de *spots* com MALDI TOF/TOF, permitindo comparar amostras com diferentes níveis de patogenicidade.



**Figura 14:** Perfil proteico de *Brucella ovis* WT e  $\Delta abcAB$  durante cultivo *in vitro* obtido pela eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE). Imagens fluorescentes de gel 2D SDS-PAGE a 12% com tiras de IPG de 18 cm, pH 4 a 7, contendo proteínas de WT marcadas com Cy5 (vermelho) e proteínas de  $\Delta abcAB$  marcadas com Cy3 (verde). Uma mistura de ambas as amostras foi marcada com Cy2 (azul) e utilizada como normalizador para DIGE. A sobreposição das imagens de WT e  $\Delta abcAB$  permite visualizar *spots* com diferenças qualitativas de expressão entre as amostras (setas). Figura é representativa de um único gel.



**Figura 15: Mapa proteico e análise de componentes principais (PCA) de spots diferentemente expressos em *Brucella ovis* WT e mutante  $\Delta abcAB$ .** (A) *Heat map* ilustra intensidade média de expressão de 100 spots em *B. ovis*  $\Delta abcAB$  (esquerda) e WT (direita) em relação ao normalizador. Cada linha corresponde a um spot com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de expressão entre os grupos. (B) Visualização do padrão de distribuição dos 100 spots através de PCA, sendo seis spots identificados como *outliers*. Delimitação oval contém amostras com 95% de confiança. Números correspondem aos spots identificados na Figura 16. (C) Padrão de distribuição das amostras obtidas em quatro géis em relação aos grupos WT e  $\Delta abcAB$ .



**Figura 16: Seleção de spots proteicos diferentemente expressos em *Brucella ovis* e mutante  $\Delta abcAB$  através de eletroforese diferencial em gel fluorescente (DIGE).** (A) Géis bidimensionais SDS-PAGE 12% corados por *Coomassie brilliant blue* (IPG pH 4-7, 7 cm) demonstram spots de proteínas selecionados para identificação por espectrometria de massa. Spots selecionados da amostra WT (esquerda) apresentam expressão diminuída em  $\Delta abcAB$  e spots selecionados da amostra  $\Delta abcAB$  (direita) apresentam expressão aumentada. (B) Figuras 3D representativas de spots com expressão diminuída (esquerda) e aumentada (direita) no mutante  $\Delta abcAB$ .

**Tabela 5. Classificação funcional de proteínas com expressão diminuída em *Brucella ovis*  $\Delta abcAB$  ( $p < 0,05$ ).**

<i>Spot</i> <sup>a</sup>	Identificação proteica <sup>b</sup>	Volume <sup>c</sup>	GI <sup>d</sup>	Gene
<b>Proteína de membrana externa</b>				
8+9	31 kDa immunogenic protein	-27.37	gi 5202891	BOV_1156
12+19	31 kDa immunogenic protein	-6.08	gi 5202891	BOV_1156
18+20	31 kDa immunogenic protein	-4.84	gi 5202891	BOV_1156
<b>Transportadores ABC de açúcar</b>				
10	ABC transporter sugar binding protein	-14.1	gi 1198362*	BMEII0590*
16	ABC transporter sugar binding protein	-6.48	gi 1198362*	BMEII0590*
31	ABC transporter sugar binding protein	-3.56	gi 1198362*	BMEII0590*
34	ABC transporter sugar binding protein	-3.36	gi 1198362*	BMEII0590*
14	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	-7.08	gi 1198207*	BMEII0435*
21	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	-4.3	gi 1198207*	BMEII0435*
30	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	-3.75	gi 1198207*	BMEII0435*
32	D-xylose-binding periplasmic protein precursor	-3.44	gi 1197917*	BMEII0146*
50	ABC transporter periplasmic glycerol-3-phosphate-binding protein	-2.32	gi 5204123	BOV_A0617
117	ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	-2.25	gi 5204064	BOV_A0240
<b>Transportadores ABC de aminoácido</b>				
15	glycine betaine/L-proline ABC transporter binding protein prox	-7.08	gi 1198322*	BMEII0550*
23	oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	-4.14	gi 5203758	BOV_A0467
36	oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	-3.23	gi 5203758	BOV_A0467
134	oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	-1.53	gi 5203758	BOV_A0467
38	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-2.94	gi 5204134	BOV_A0894
55	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	-2.08	gi 5202558	BOV_1974
136	ABC transporter periplasmic amino acid binding protein	-1.52	gi 5203023	BOV_A1095
<b>Resposta ao estresse metabólico</b>				
25	co-chaperonin GroES	-4.08	gi 5203793	BOV_A0178
42	co-chaperonin GroES	-2.67	gi 5203793	BOV_A0178
35	Acid stress chaperone HdeA	-3.23	gi 5203776	BOV_A0312
33+47	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps	-2.94	gi 5201095	BOV_2062
37+48	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps	-2.74	gi 5201095	BOV_2062
40	superoxide dismutase, Cu-Zn	-2.83	gi 5203847	BOV_A0659
44	superoxide dismutase, Cu-Zn	-2.62	gi 5203847	BOV_A0659
22	superoxide dismutase, Fe-Mn family	-4.17	gi 5202836	BOV_0567
46	superoxide dismutase, Fe-Mn family	-2.59	gi 5202836	BOV_0567
131	superoxide dismutase, Fe-Mn family	-1.57	gi 5202836	BOV_0567
<b>Enzimas metabólicas</b>				
<i>Metabolismo de nucleotídeos</i>				
29	nucleoside diphosphate kinase	-3.79	gi 5201998	BOV_0685
<i>Metabolismo proteico</i>				
50	isovaleryl-CoA dehydrogenase	-2.32	gi 5202101	BOV_0017
<i>Metabolismo de carboidratos</i>				
56	putative transaldolase	-2.05	gi 5201313	BOV_1738

**Biossíntese proteica**

11	ribosome recycling factor	-9.56	gi 5202626	BOV_1116
----	---------------------------	-------	------------	----------

**Biossíntese de vitamina**

53	riboflavin synthase subunit alpha	-2.14	gi 5202369	BOV_0761
----	-----------------------------------	-------	------------	----------

**Função inespecífica**

17	hypothetical protein	-5.56	gi 5202567	BOV_0865
----	----------------------	-------	------------	----------

<sup>a</sup>Número corresponde aos *spots* proteicos indicados na Figura 16.

<sup>b</sup>Função predita das proteínas de acordo com NCBI.

<sup>c</sup>Volume médio da intensidade de expressão dos *spots* em relação à amostra WT.

<sup>d</sup>Número de acesso corresponde ao banco de dados de *Brucella ovis* em NCBI

\* Pseudogenes em *B. ovis*. Número de acesso corresponde ao banco de dados de *Brucella melitensis* 16M.

**Tabela 6. Classificação funcional de proteínas com expressão aumentada ( $p < 0,05$ ) em *Brucella ovis*  $\Delta abcAB$ .**

<i>Spot</i> <sup>a</sup>	Identificação proteica <sup>b</sup>	Volume <sup>c</sup>	GI <sup>d</sup>	Gene
<b>Transportadores ABC</b>				
1	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	3.66	gi 5201724	BOV_0736
3	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	2.33	gi 5201724	BOV_0736
69	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	1.76	gi 5201724	BOV_0736
71	nickel ABC transporter substrate binding protein	1.69	gi 5204178	BOV_A0754
73	nickel ABC transporter substrate binding protein	1.67	gi 5204178	BOV_A0754
<b>Metabolismo de carboidrato</b>				
4	succinyl-CoA synthetase beta chain	2.32	gi 5201923	BOV_1855
61	succinyl-CoA synthetase beta chain	1.95	gi 5201923	BOV_1855
66	malate dehydrogenase	1.79	gi 5201532	BOV_1856
70	malate dehydrogenase	1.7	gi 5201532	BOV_1856
<b>Metabolismo protéico</b>				
76	zinc protease	1.54	gi 5203839	BOV_A0188
<b>Regulação de transcrição</b>				
67	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	1.78	gi 5201943	BOV_1014
<b>Resposta ao estresse metabólico</b>				
83	60kDa chaperonin GroEL	1.5	gi 5203035	BOV_A0177
<b>Função inespecífica</b>				
7	metal-dependent hydrolase	2.04	gi 5203223	BOV_A0561
63	metal-dependent hydrolase	1.85	gi 5203223	BOV_A0561
81	aldo/keto reductase family, oxidoreductase	1.52	gi 5203362	BOV_A0164

<sup>a</sup>Número corresponde aos *spots* proteicos indicados na Figura 16.

<sup>b</sup>Função predita das proteínas de acordo com NCBI.

<sup>c</sup>Volume médio da intensidade de expressão dos *spots* em relação à amostra WT

<sup>d</sup>Número de acesso corresponde ao banco de dados de *Brucella ovis* em NCBI

### 5.11. Predição de interação entre as proteínas identificadas em cada grupo experimental

Através do programa *String*, redes de interações foram construídas a partir das proteínas com expressão diminuída (Figura 17) ou aumentada (Figura 18) na amostra mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*. As figuras 17 e 18 ilustram diferentes tipos de associações preditas entre as proteínas foram representadas por linhas de cores distintas (verde – vizinhança; vermelho – fusão gênica; azul – co-ocorrência; preto – co-expressão; roxo – dados experimentais; azul claro – base de dados; e amarelo – publicações).

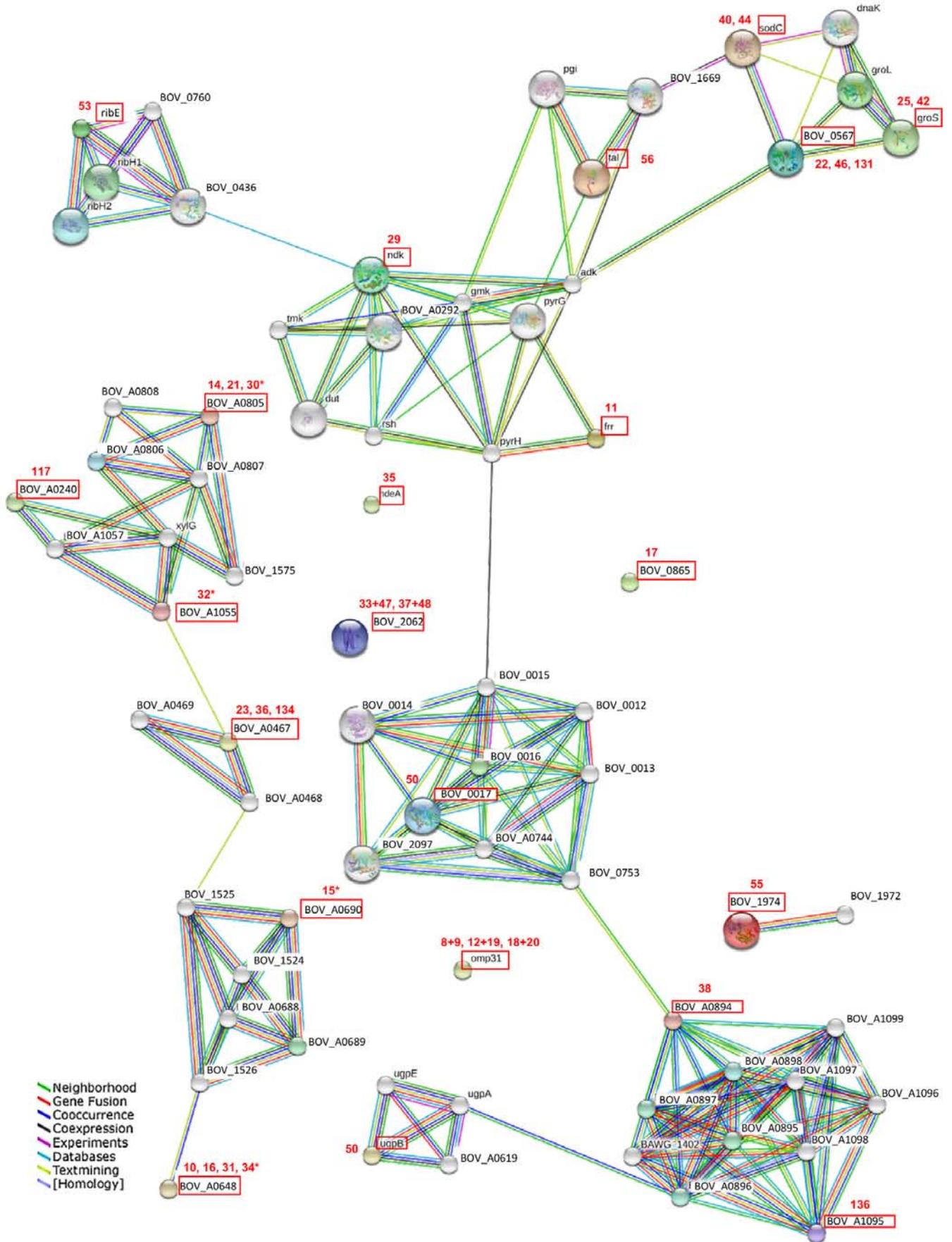
As proteínas com expressão diminuída em  $\Delta abcAB$  foram agrupadas principalmente com proteínas envolvidas na resposta ao estresse metabólico e no transporte de substratos. As proteínas codificadas em regiões consideradas pseudogenes em *B. ovis* foram relacionadas a outras proteínas transportadoras caracterizadas em *B. melitensis* (Figura 17). Cinco proteínas identificadas, que incluem uma proteína hipotética (BOV\_0865), transportadora ABC (BOV\_1974), proteína Dps (BOV\_2062), chaperona HdeA e proteína de membrana externa Omp31, não se associaram a estes grupamentos. As proteínas com expressão aumentada em  $\Delta abcAB$  foram agrupadas com proteínas relacionadas ao metabolismo bacteriano. Quatro proteínas identificadas, que incluem as enzimas hidrolase (BOV\_A0561), oxireductase (BOV\_A0164), desidrogenase WrbA e uma protease de zinco (BOV\_A0188), não apresentaram interação com as demais (Figura 18). A partir destas informações, algumas proteínas foram discutidas a seguir, considerando sua função

predita, interação e provável interferência na patogenicidade de *B. ovis*.

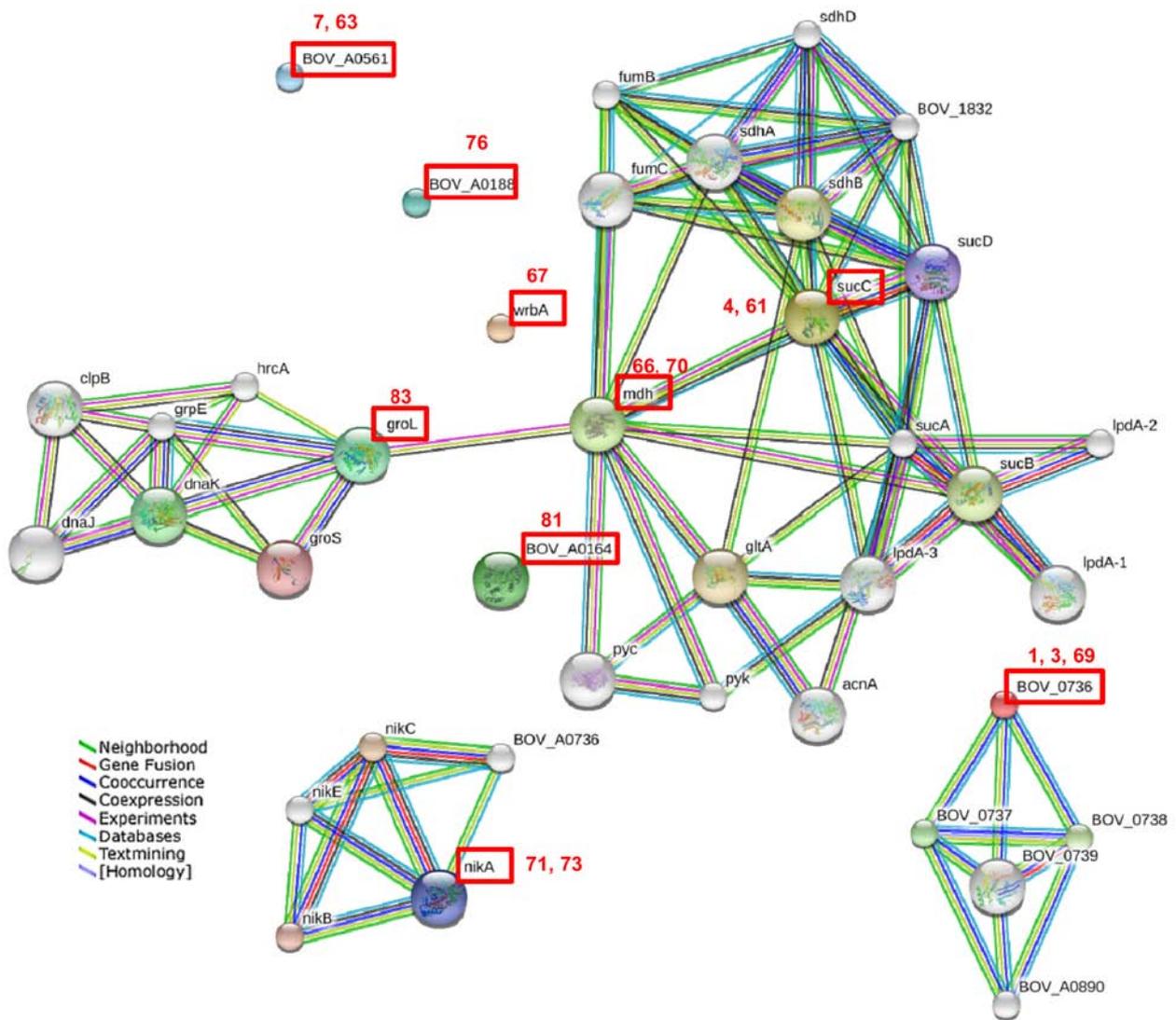
### 5.12. Transportador ABC de *Brucella ovis* interfere na expressão de proteínas de diversos grupos funcionais

#### 5.12.1 Proteínas transportadoras ABC

*B. ovis*  $\Delta abcAB$  apresentou diminuição de expressão de proteínas ligadoras a substrato de 10 distintos transportadores ABC, dentre eles os que importam glicina/betaína/L-prolina (ProX), oligopeptídeos, D-ribose (RbsB), D-xilose (XylF), glicerol (UgpB), e outros açúcares e aminoácidos (Tabela 5). Isto demonstra que a deleção de ATPases de potencial ABC importador de peptídeo em *B. ovis* interfere em outros sistemas ABC, podendo comprometer o metabolismo e crescimento do mutante  $\Delta abcAB$ , por não importar fonte energética e proteica suficientes para sobreviver. Interessantemente, em células eucariotas, há evidência de conservação de ATPases e que estão associadas a diversas atividades celulares (denominadas AAA), inclusive na remodelação e degradação proteica, na formação de proteínas complexas e no transporte transmembrana (Ogura e Wilkinson, 2001). Desta forma, a deleção de um gene que codifica ATPase comprometeria mecanismos celulares vitais. Contudo, não há indícios de que transportadores com funções distintas conservam a proteína ATPase em procariotos, apesar da caracterização de sistemas ABC e do funcionamento de ATPases em bactérias (Tam e Saier, 1993; van der Heide e Poolman, 2002; Campbell e Sansom, 2005).



**Figura 17: Predição de possíveis interações entre proteínas com expressão diminuída em *Brucella ovis*  $\Delta abcAB$ .** Total de 22 proteínas (quadrado vermelho) identificadas em géis de *B. ovis* WT apresentavam expressão diminuída em comparação a *B. ovis* WT. Números correspondem à identificação dos *spots*. Asterisco representa proteínas identificadas que foram anotadas como pseudogenes em *B. ovis*. Linhas representam possíveis associações entre proteínas, de acordo com tipos de evidências: verde – vizinhança; vermelho – fusão gênica; azul – co-ocorrência; preto – co-expressão; roxo – dados experimentais; azul claro – base de dados; amarelo – publicações.



**Figura 18: Predição de possíveis interações entre proteínas com expressão aumentada em *Brucella ovis*  $\Delta abcAB$ .** Total de nove proteínas (quadrado vermelho) identificadas em géis de *B. ovis*  $\Delta abcAB$  apresentavam expressão aumentada em comparação a *B. ovis* WT. Números correspondem à identificação dos *spots*. Linhas representam possíveis associações entre proteínas, de acordo com tipos de evidências: verde – vizinhança; vermelho – fusão gênica; azul – co-ocorrência; preto – co-expressão; roxo – dados experimentais; azul claro – base de dados; amarelo – publicações.

O crescimento *in vitro* de  $\Delta abcAB$  foi similar ao de WT em meio rico líquido (Figura 4) e em placa (Silva et al., 2011), o que sugere a presença de mecanismos compensatórios para importar nutrientes disponíveis no meio. Contudo, as vias alternativas de transporte possivelmente não são suficientes em ambiente com restrição nutricional, como ocorre no meio intracelular. Assim como se sabe da dificuldade de *B. ovis*  $\Delta abcAB$  sobreviver em macrófagos de camundongos (Silva et al., 2011), foi demonstrado a sua incapacidade de persistir no meio intracelular em linhagem de células epiteliais HeLa (Figura 7 e 8). A restrição no transporte de substratos, juntamente com o comprometimento na expressão do SST4, poderiam justificar o fenótipo do mutante  $\Delta abcAB$ . Adicionalmente, há indícios de que proteínas periplasmáticas do sistema ABC têm funções secundárias na conformação proteica e na resposta bacteriana ao estresse, como caracterizado para proteínas chaperonas no citoplasma (Richarme e Caldas, 1997). Apesar de não ter sido comprovada esta função no gênero *Brucella*, a diminuição de inúmeras proteínas ligadoras ao substrato em *B. ovis*  $\Delta abcAB$  pode influenciar na remodelação e renaturação das proteínas a nível pós transcricional durante a restrição nutricional.

O mutante  $\Delta abcAB$  de *B. ovis* apresentou aumento de expressão de duas proteínas periplasmáticas do sistemas ABC, sendo uma delas ligadora ao níquel (NikA). A proteína NikA compõe um dos principais sistema ABC de importação de níquel (*nikA-E*) bem caracterizado no gênero *Brucella*, sendo associada à atividade enzimática da urease em espécies zoonóticas, como *B. suis* (Jubier-Maurin et al., 2001).

A função do locus *abcA-E* de *B. ovis* foi predita em atuar como importador de peptídeo e/ou níquel, podendo a deleção deste transportador ter interferido

diretamente na importação de níquel. O aumento de NikA disponível no periplasma pode ser um mecanismo compensatório de  $\Delta abcAB$  para captar mais níquel e favorecer seu crescimento, sugerindo que a proteína codificada pelo locus *nikA-E* pode ser funcional. Análise genômica de *B. ovis* evidenciou que um dos genes deste sistema ABC (*nikD*) é considerado pseudogene, no qual poderia resultar em um sistema afuncional. Porém, aumento da expressão de NikA observado na proteômica indica que este sistema é transcrito e potencialmente funcional em *B. ovis*. Assim, pode-se sugerir que o transportador *abcA-E* de *B. ovis* possui um papel no transporte de níquel, contudo, o mutante  $\Delta abcAB$  utilizou vias alternativas para importar o substrato, possivelmente através do sistema transportador *nikA-E*.

Surpreendentemente, na análise proteômica, não foram identificadas as duas proteínas ligadora ao ATP do sistema ABC que foram deletadas no mutante  $\Delta abcAB$  (BOV\_A500 e BOV\_A501). Assim, devem-se levar em conta duas possibilidades: a dificuldade de extração eficiente de proteínas associadas à bicamada lipídica, o que pode comprometer a recuperação de outros fatores de patogenicidade presentes nesta região; ou as proteínas do sistema ABC deletados estão entre os *spots* não extraídos ou não identificados por MS. Contudo, a diminuição de expressão de cinco transportadores ABC de aminoácidos evidencia que na amostra  $\Delta abcAB$  há comprometimento de um sistema ABC funcional relacionado à importação de peptídeo, como sugerido anteriormente (Silva et al., 2011; Figura 3).

#### 5.12.2. Proteínas de membrana

A maior diferença de expressão proteica foi observada em *spots* identificados como proteína de membrana externa Omp31 (BOV\_1156), que foi menos expressa no mutante  $\Delta abcAB$ . OMP possuem importante

papel na invasão celular e na resposta imunogênica em *Brucella* spp., apresentando elevada expressão durante a fase logarítmica de crescimento (Vizcaíno et al., 1996; Rossetti et al., 2009). Contudo, estudos têm demonstrado que, em *B. ovis*, Omp31 não é essencial para sua sobrevivência intracelular (Caro-Hernandez et al., 2007; Martín-Martín et al., 2008), apesar de ter papel imunogênico em espécies rugosas (Clockaert et al., 2002). Além disso, Omp31 se assemelha à proteína ligadora de hemina (HbpA), sendo o aumento na síntese de Omp31 em *Brucella* spp. associado à condição restrita de ferro no meio (Delpino et al., 2006). Wang et al. (2009 e 2010) demonstraram em análise proteômica que mutante *virB* de *B. melitensis* apresenta defeito na expressão de Omp31, sugerindo que o SST4 interfere na expressão de proteínas de membrana. Porém, outros estudos são necessários para esclarecer se há interferência direta do sistema ABC sobre OMP.

### 5.12.3. Resposta ao estresse metabólico

Diante de estresse metabólico devido à elevada acidez, temperatura, peróxido ou restrição nutricional, bactérias são capazes de responder com a produção de proteínas, como chaperonas e superóxido dismutase, que minimizam os danos e favorecem a sobrevivência do patógeno (Ko e Splitter, 2003; Moreno e Moriyón, 2006). Ao avaliar proteínas induzidas em condição de estresse ambiental, foram observadas em *B. ovis*  $\Delta abcAB$  uma diminuição de chaperonas GroES e HdeA, superóxido dismutase Fe/Mn e Cu/Zn e de proteína Dps (Tabela 5).

Dois tipos de superóxido dismutase (Sod) são conservados no gênero *Brucella*, Sod Fe/Mn (SodB) e Sod Cu/Zn (SodC), e estão presentes no citoplasma e periplasma, respectivamente (Stabel et al., 1994; Teixeira-Gomes et al., 2000). A produção de enzimas Sod tem importante papel na

sobrevivência de patógenos intracelulares, uma vez que permite evadir a respiração oxidativa de fagócitos (Ko e Splitter, 2003). Em *B. abortus*, a deleção de Sod resulta na atenuação da bactéria em macrófagos e durante a infecção *in vivo* (Gee et al., 2005). Portanto, deve-se considerar a interferência parcial de Sod sobre o fenótipo de *B. ovis*  $\Delta abcAB$ , uma vez que é incapaz de persistir no meio intracelular (Figura 8) e *in vivo* (Silva et al., 2011).

Proteínas chaperonas GroEL/GroES são expressas sob estresse térmico ou em meio mínimo ácido, o qual mimetiza o compartimento durante fase inicial do tráfego intracelular. (Moreno e Moriyón, 2006). Análises proteômicas têm demonstrado elevada expressão de chaperonas, associado à elevada expressão de transportadores ABC, em mutantes que apresentam privação nutricional ou comprometimento metabólico (Lamontagne et al., 2006). A diminuição de GroES em *B. ovis*  $\Delta abcAB$  possivelmente está associada à diminuição de expressão de proteínas transportadoras e, em consequência, a menor adaptação do mutante à fase de estresse metabólico.

### 5.12.4. Metabolismo e biossíntese

Enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, nucleotídeos e proteínas, tais como transaldolase, isovaleril-CoA dehydrogenase e nucleosídeo quinase (NdK), apresentaram expressão diminuída em *B. ovis*  $\Delta abcAB$ , enquanto protease dependente de zinco e succinil-CoA sintetase (SucC) apresentaram expressão aumentada. Sabe-se que transaldolase está envolvida no catabolismo de glicose em *Brucella* spp. (Moreno e Moriyón, 2006), sendo o aumento desta enzima relacionada ao crescimento e metabolismo bacteriano. Além disso, o aumento de SucC e de outras enzimas relacionadas ao ciclo de Krebs têm sido observado durante crescimento de *Brucella* spp. em condição de estresse ou

intracelular (Al Dahouk et al., 2008 e 2010), sendo uma tentativa do patógeno de induzir maior produção de acetil-CoA. Assim, o aumento de SucC pode ser em resposta à diminuição de transaldolase durante o cultivo de  $\Delta abcAB$ , favorecendo, assim, o seu crescimento *in vitro*.

Adicionalmente, o mutante  $\Delta abcAB$  apresentou diminuição na expressão de riboflavina sintase, na qual é necessária para a biossíntese final de riboflavina, que é essencial na síntese de cofatores da flavoproteína (Zylberman, et al., 2006). Foi demonstrado que o metabolismo de riboflavina está relacionada à patogênese de *Brucella* spp., uma vez que a deleção de enzimas desta via interfere na sobrevivência *in vitro* intracelular e *in vivo* da bactéria (Bonomi et al., 2010). Assim, a diminuição de riboflavina sintase pode ser um fator adicional que compromete a patogenicidade da amostra  $\Delta abcAB$  de *B. ovis*.

O cultivo *in vitro* de *Brucella* spp. em meio rico pode interferir no mecanismo de utilização dos substratos fornecidos no meio, resultando na ativação de vias metabólicas alternativas, as quais não seriam utilizadas durante o cultivo em meio mínimo ou intracelular. O uso de meio rico é uma limitação para a análise proteômica, uma vez que mudanças metabólicas existentes entre as amostras WT e  $\Delta abcAB$  *in vitro* podem não justificar completamente o fenótipo observado no meio intracelular. Assim, os resultados proteômicos relacionados ao metabolismo bacteriano devem ser cautelosamente interpretados.

## 6. CONCLUSÃO

Com este trabalho, conclui-se que:

- (i) O transportador ABC de *B. ovis* tem a função predita de importar oligopeptídeo, dipeptídeo ou níquel;

- (ii) o transportador ABC codificado por *abcA-E* é essencial para *B. ovis* escapar da fusão fagolisossomal em células HeLa;
- (iii) a deleção do transportador ABC codificado por *abcA-E* compromete a expressão de SST4 a nível pós transcricional e de outros fatores de patogenicidade, como Omp31, chaperonas, SodC e sistemas ABC de importação de açúcares e aminoácidos, que atuam na sobrevivência intracelular e, portanto, na virulência de *B. ovis*;
- (iv) a ausência de um único sistema ABC compromete parcialmente o metabolismo e biossíntese proteica de *B. ovis*, mas não o crescimento *in vitro* em meio rico;
- (v) regiões genômicas anotadas como pseudogenes em *B. ovis* potencialmente codificam proteínas funcionais.

## 7. TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Spots de proteínas com expressão diminuída em  $\Delta abcAB$  de *Brucella ovis*.

Spot	Gene	Função predita	Escore	% cobertura	Predito/Experimental		Sequência peptídeo
					pI	Massa (kDa)	
8+9	BOV_1156	31 kDa immunogenic protein	280	17	5.49/5.78	33/30.5	100-114 R.LLATLYPETIHIVAR.K 130-144 R.VSLDEPGSGTIVDAR.I 145-158 R.IVLEAYGLTEDDIK.A 159-170 K.AEHLKPGPAGER.L
10	BOV_A0648	ABC transporter sugar binding protein	171	14	4.97/4.90	43.3/39.3	11-32 K.QNVEVLHWWTSGGEASALEVLK.K 63-80 R.VTAGNAPTAVQMLGFDIR.D 221-230 R.TYVDDNFSGR.D 263-272 K.KPGEDFVCMR.Y
11	BOV_1116	ribosome recycling factor	164	19	6.3/6.67	20.7/23.8	2-12 M.SDAFDINDLKR.R 85-100 R.DSGLGLNPITDGMTLR.I + Oxidação (M) 117-126 K.IAHQYAEQGR.I
12+19	BOV_1156	31 kDa immunogenic protein	123	9	5.49/5.54	33/30.5	100-114 R.LLATLYPETIHIVAR.K 145-158 R.IVLEAYGLTEDDIK.A
14	BOV_A0805*	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	155	14	5.6/4.82	31/28.2	129-144 K.YVELFGAPSDNNAATR.S 216-230 K.VGGFDGSPDAIAAIK.A 269-278 K.QLFDCILITK.D
15	BOV_A0690*	glycine betaine/L-proline ABC transporter substrate-binding protein	168	16	5.57/5.27	31.8/29.5	59-75 K.VELVQTDVAPLYQGVS.R.G 141-156 K.LKGEIQGIDPGAGLTR.L 217-230 K.GALGGAEHIDAVAR.K
16	BOV_A0648*	sugar binding protein	101	5	4.97/4.84	43.3/39.9	103-113 K.VIPAPLQEFK.Y 221-230 R.TYVDDNFSGR.D
17	BOV_0865	hypothetical protein	80	5	5.07/5.31	24.8/29	153-166 K.ISGLDGAEAEFLAR.E
18+20	BOV_1156	31 kDa immunogenic protein	89	9	5.49/6.05	33/30.9	100-114 R.LLATLYPETIHIVAR.K 145-158 R.IVLEAYGLTEDDIK.A
21	BOV_A0805*	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	99	10	5.6/4.75	31/28.4	129-144 K.YVELFGAPSDNNAATR.S 216-230 K.VGGFDGSPDAIAAIK.A
22	BOV_0567	superoxide dismutase, Fe-Mn family	78	15	5.83/6.10	22.5/23	2-21 M.AFELPALPYDYDALAPFMSR.E + Oxidação (M) 100-110 K.AFDSDLGGYDK.F

23	BOV_A0467	oligopeptide ABC transporter substrate-binding	162	8	5.09/5.02	59/52	227-238 K.IDTVNWMPFEDR.S 309-317 R.EFMADEVWR.G + Oxidação (M) 341-351 K.LDFADEDILDR.E 361-374 K.EAGVEPNTLSVTLR.Y
25	BOV_A0178	co-chaperonin GroES	122	16	5.83/5.56	10.3/12.5	36-51 K.EKPQEGEVVAAGAGAR.D + Glu->pyro-Glu (N-term E)
29	BOV_0685	nucleoside diphosphate kinase	91	15	5.27/5.52	15.2/17.1	6-16 R.TFSMIKPDATR.R + Oxidação (M) 45-55 R.REAEGFYAVHK.D
30	BOV_A0805*	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	75	10	5.6/4.67	31/28.2	129-144 K.YVELFGAPSDNNAATR.S 216-230 K.VGGFDGSPDAIAAIK.A
31	BOV_A0648*	sugar binding protein	85	5	4.97/4.79	43.3/40.3	103-113 K.VIPAPLQEFK.Y 221-230 R.TYVDDNFSGR.D
32	BOV_A1055*	D-xylose-binding periplasmic protein precursor	82	8	5.05/5.03	34.2/34.1	30-40 R.DRDYFIAAAEK.L 102-118 R.LILNADIDAYISFDNER.V
33+47	BOV_2062	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps	160	28	5.25/5.34	18.3/18.5	48-62 K.GPQFIHVHMLDGFR.A + Oxidação (M) 63-75 R.AELDDHVDTIAER.A 130-148 K.DADDAGDDDTADIFTAASR.S
34	BOV_A0648*	sugar binding protein	170	7	4.97/5.02	43.3/39.7	103-113 K.VIPAPLQEFK.Y 221-230 R.TYVDDNFSGR.D 263-272 K.KPGEDFVCMR.Y
35	BOV_A0312	Acid stress chaperone HdeA	121	21	6.59/5.82	12.5/12.5	71-95 K.GKEEDAVIDVDGIETVTPAIIIEACK.Q
36	BOV_A0467	oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	133	6	5.09/4.98	59/52	227-238 K.IDTVNWMPFEDR.S 309-317 R.EFMADEVWR.G 361-374 K.EAGVEPNTLSVTLR.Y
37+48	BOV_2062	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps	266	36	5.25/5.58	18.3/18	48-62 K.GPQFIHVHMLDGFR.A + Oxidação (M) 63-75 R.AELDDHVDTIAER.A 130-148 K.DADDAGDDDTADIFTAASR.S 153-165 K.ALWFLEAHVQESN.-
38	BOV_A0894	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	120	6	5.31/5.35	43.3/39.7	237-249 K.QAAEFGIVAGGQR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) 332-344 K.KLHEMPVEDVFAR.H + Oxidação (M)
40	BOV_A0659	superoxide dismutase, Cu-Zn	76	23	6.24/6.70	18.2/16.1	38-54 K.EVGTVIVISEAPGGLHFK.V 144-167 R.SLMHVGGDNYSKPEPLGGGAR.F + Oxidação (M)
42	BOV_A0178	co-chaperonin GroES	92	16	5.83/5.43	10.3/12.6	36-51 K.EKPQEGEVVAAGAGAR.D
44	BOV_A0659	superoxide dismutase, Cu-Zn	79	23	6.24/6.52	18.2/16.3	38-54 K.EVGTVIVISEAPGGLHFK.V 144-167 R.SLMHVGGDNYSKPEPLGGGAR.F + Oxidação (M)
46	BOV_0567	superoxide dismutase, Fe-Mn family	94	15	5.83/5.90	22.5/22.9	2-21 M.AFELPALPYDYDALAPFMSR.E + Oxidação (M) 100-110 K.AFDSDLGGYDK.F

50	BOV_0017	isovaleryl-CoA dehydrogenase	118	9	5.28/5.47	41.9/41.3	34-43 R.NNQFPMHLWR.E + Oxidação (M) 231-243 K.GVNVLMGLDYER.V 285-296 K.LADMYVTFNASR.A 76-90 K.GNYPETLNAGIAAFR.S
	BOV_A0617	ABC transporter periplasmic glycerol-3-phosphate-binding protein	96	3			
53	BOV_0761	riboflavin synthase subunit alpha	248	21	5.02/5.10	22.3/24.5	16-26 R.VKPLNEGVLRL.I 63-74 R.WFEVEAWEEALR.L 168-178 R.HSLEVTTWGER.K 184-193 K.VNIEIDQLAR.Y
55	BOV_1974	ABC transporter periplasmic substrate - binding protein	102	13	5.45/4.99	33.2/36.2	64-81 K.FIYQSAQGNPATAAQIAR.Q 239-250 K.LPLFTADTDSVK.R 304-315 K.MGVEFPQAVIDR.A + Oxidação (M)
56	BOV_1738	putative transaldolase	72	4	5.69/6.0	23.6/24.4	149-157 U R.TIYDNYDFR.T
117	BOV_A0240	putative sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	145	10	5.37/5.27	36.3/36.4	109-120 K.VIAYDRPIPIAK.S 121-134 K.SDFYVSFDNEAIGK.S 200-210 K.AQQWASGQITR.F
131	BOV_0567	superoxide dismutase, Fe-Mn family	108	15	5.83/5.12	22.5/39.6	2-21 M.AFELPALPYDYDALAPFMSR.E 100-110 K.AFDSLGGYDK.F
134	BOV_A0467	oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	100	7	5.09/5.08	59/51.4	274-286 R.LAPYLGIIYVDIK.G 341-351 K.LDFADEDILDR.E 361-374 K.EAGVEPNTLSVTLR.Y
136	BOV_A1095	ABC transporter periplasmic amino acid binding protein	228	15	5.46/5.29	43.7/40.9	91-103 K.IYDNQSNVNLSVR.Q 138-153 R.IPMVQGGGASDEIYSR.N + Oxidação (M) 183-204 K.VTNVALVYADDSFDVSVADGTR.K 267-280 K.LYSFTVGVPTEDFR.K

\*Considerados pseudogenes em *B. ovis* (NCBI).

**Tabela S2. Spots de proteínas com expressão aumentada em  $\Delta abcAB$  de *Brucella ovis*.**

Spot	Gene	Função predita	Escore	% cobertura	Predito/Experimental		Sequência peptídeo
					pl	Massa (kDa)	
1	BOV_0736	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	318	18	5.3/5.18	37.3/32	54–65 K.GEWSGFDVDYCR.A 89–102 R.FTALQSGEVDVLR.N 181-192 K.LEEANAAYDSGR.C 193-207 R.CDAYTTDQSSLYGVR.L 303-313 K.GVGNYGELFER.N
3	BOV_0736	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	158	10	5.3/5.06	37.3/32	54–65 K.GEWSGFDVDYCR.A 89–102 R.FTALQSGEVDVLR.N 303–313 K.GVGNYGEIFER.N
4	BOV_1855	succinyl-CoA synthetase beta chain	83	5	4.9/5.08	42.6/44.3	99-108 R.ELYLSLLVNR.E + Glu->pyro-Glu (N-term E) 208-217 K.VSFDNNALFR.H
7	BOV_A0561	metal-dependent hydrolase	186	33	5.58/6.00	25.3/26.6	43-65 R.GVTHIALTHGHGDHVGDTVAIAR.E 66-88 R.EHGATVIANADLASWLGSQGVEK.L 174-187 R.FTMGGAVAALACQR.Y 188-207 R.YFNFNSVLPCHYASFPIIDR.T
61	BOV_1855	succinyl-CoA synthetase subunit beta	162	8	4.9/5.01	42.6/44	84-94 R.LYIEDGADIER.E 95-104 R.ELYLSILIDR.S 204-213 K.VSFDNNALFR.H
63	BOV_A0561	metal-dependent hydrolase	146	16	5.58/5.83	25.3/26.6	25-34 K.ITWLGHAAFR.V 196-209 R.FTMGGAVAGLACQR.Y + Oxidation (M) 210-229 R.YFNFNSVLPCHYASFPIIDR.T
66	BOV_1856	malate dehydrogenase	95	12	5.24/5.55	33.8/38	60-83 K.FTGANDYAAIEGADVIVTAGVPR.K 253-267 R.VLPVAAQLSGQYGVK.D
67	BOV_1014	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	320	30	5.85/6.32	21.4/25.5	37-48 K.RVPELVPEEVAK.A 54-79 K.IDQEAPIATPGELADYDAIIIGTATR.Y 89-100 K.NFLDQTGGLWAK.G 174-184 R.QPSAQELDDAR.F + Gln->pyro-Glu (N-term Q)
69	BOV_0736	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	201	18	5.3/5.31	37.3/32.2	54–65 K.GEWSGFDVDYCR.A 89–102 R.FTALQSGEVDVLR.N 181-192 K.LEEANAAYDSGR.C 193-207 R.CDAYTTDQSSLYGVR.L 303-313 K.GVGNYGELFER.N

70	BOV_1856	malate dehydrogenase	209	16	5.24/ 5.29	33.8/38.4	60-83 K.FTGANDYAAIEGADVIVTAGVPR.K 186-199 R.YSTVAGIPLPDLVK.M 253-267 R.VLPVAAQLSGQYGVK.D
71	BOV_A0754	nickel ABC transporter substrate binding protein	133	7	58.3/53.1	5.52/5.82	97-109 K.FSNGEVFDAAAVK.A 110-121 K.ANIDTVLQNRPR.H 455-471 K.IDAEIGQVLVSTDETAR.Q
73	BOV_A0754	nickel ABC transporter substrate binding protein	114	7	58.3/52.2	5.52/5.70	110-121 K.ANIDTVLQNRPR.H 397-408 K.LTGEEESSIYAR.Q 455-471 K.IDAEIGQVLVSTDETAR.Q
76	BOV_A0188	zinc protease	87	5	49.1/44.6	5.07/4.88	166-177 R.QQIVAGIEAAQR.N + Gln->pyro-Glu (N-term Q) 187-199 K.FAEVLYGNHPYAR.D
81	BOV_A0164	aldo/keto reductase family oxidoreductase	304	11	39.9/29.7	8.76/6.51	158-170 K.LWNSDQGYESTLK.A 262-276 K.HDIATEAWSPLGQGK.L 301-312 R.WHIETGNVIPK.S
83	BOV_A0177	chaperonin GroEL	281	10	57.5/54.4	5.08/5.32	59-75 K.EVELEDKFENMGAQMLR.E + Glu->pyro-Glu (N-term E) 59-75 K.EVELEDKFENMGAQMLR.E + Oxidation (M) 351-362 K.QQIEETLDYDR.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) 405-421 R.AAVEEGIVAGGGTALLR.A 430-443 K.GVNADQEAGINIVR.R

**Tabela S3. Spots não identificados por espectrometria de massa**

Grupo	Nº do Spot	Total
WT	28, 41, 43, 54, 116, 119, 121, 122, 124, 126, 130, 135, 138	13
<i>ΔabcAB</i>	6, 60, 65, 68, 74, 77, 78, 79, 80, 82	10
Total não identificado		23

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUHAMAD, W.N.; MANSON, M.; GIBSON, M.M.; et al. Peptide transport and chemotaxis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: characterization of the dipeptide permease (Dpp) and the dipeptide-binding protein. *Mol. Microbiol.*, v.5, p.1035–2047, 1991.
- AL DAHOUK, S.; JUBIER-MAURIN, V.; SCHOLZ, H.C.; et al. Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics*, v.8, p.3862–3870, 2008.
- AL DAHOUK, S.; SCHOLZ, H. C.; TOMASO, H. et al. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol.*, v.10, p.2–12, 2010.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; et al. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris: INRA, 1988. 190p.
- ANDREWS J.C.; SHORT S.A. Genetic analysis of *Escherichia coli* oligopeptide transport mutants. *J. Bacteriol.*, v.161, p.484–492, 1985.
- AROCENA, G.M.; SIEIRA, R.; COMERCI, D.J.; et al. Identification of the Quorum Sensing target DNA-sequence and N-acyl Homoserine Lactone responsiveness in the *Brucella abortus* virB promoter. *J. Bacteriol.*, v.192, p.3434–3440, 2010.
- AROCENA, G.M.; ZORREGUIETA, A.; SIEIRA, R. Expression of VjbR under nutrient limitation conditions is regulated at the post-transcriptional level by specific acidic pH values and urocanic acid. *PLoS ONE*, v.7, n.4, e35394, 2012.
- 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.
- BENDER, R.A. Regulation of the histidine utilization (hut) system in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.76, p.565–584, 2012.
- 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.
- BONOMI, H.R.; MARCHESINI, M.I.; KLINKE, S.; et al. An atypical riboflavin pathway is essential for *Brucella abortus* virulence. *PLoS ONE*, v.5, e9435, 2010.
- BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; et al. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.1544–1549, 2002.
- BOWDEN, R.A.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; et al. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.*, v.63, p.3945–3952, 1995.
- 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.; TABATABAI, L.B.; JUDGE, B.A.; et al. Cloning, expression, and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.*, v.58, p.2935–2939, 1990.

- BROUGHTON, E.S.; JAHANS, K.L. The differentiation of *Brucella* species by substrate specific tetrazolium reduction. *Vet. Microbiol.*, v.51, p.253–271, 1997.
- BUDDLE, M.B.; BOYES, B.W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *Aust. Vet. J.*, v.29, p.145–153, 1953.
- 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.
- CAMPBELL, J.D.; SANSOM M.S.P. Nucleotide binding to the homodimeric MJ0796 protein: a computational study of a prokaryotic ABC transporter NBD dimer *FEBS Lett.*, v.579, p. 4193–4199, 2005.
- CARO-HERNÁNDEZ, P; FERNÁNDEZ-LAGO, L; DE MIGUEL, M...J.; et al., Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect. Immun.*, v.75, p.4050–4061, 2007.
- 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 JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER M.N.; et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rum. Res.*, v.102, n.2, p.213–222, 2012.
- CELLI, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res. Microbiol.*, v.157, n.2, p.93–98, 2006.
- CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M.; et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, v.198, p.545–556, 2003.
- 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.
- CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; PARAMITHIOTIS, E.; et al. What have we learned from *Brucella* proteomics? In: LÓPEZ-GOÑI, C.; O'CALLAGHAN, D. (Eds) *Brucella Molecular Microbiology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p.103–132, 2012.
- 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.
- CLOECKAERT, A.; VIZCAINO, N.; PAQUET, J.Y.; et al. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.229–247, 2002.
- CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; DE WERGIFOSSE, P.; et al. Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of

- monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.*, v.138, p.1543–1550, 1992.
- 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.
- CONDE-ÁLVAREZ, R.; ARCE-GORVEL, V., IRIARTE, M., et al. The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathog.*, v.8, e1002675, 2012.
- COPIN, R.; VITRY, M-A; HANOT MAMBRES, D.; et al. *In situ* microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathog.*, v.8, e1002575, 2012.
- COSTA, E.A. SANT'ANA, F.M, CARVALHO, C.J.S., et al. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the state of Piauí. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, p. 751–754, 2012.
- COVERT, J.; MATHISON, A.J.; ESKRA, L.; et al. *Brucella melitensis*, *B. neotomae* and *B. ovis* elicit common and distinctive macrophage defense transcriptional responses. *Exp. Biol. Med.*, v.234, p.1450–1467, 2010.
- 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. Identification and characterization of *Brucella* effector proteins, 2012. 169p. Thesis (Ciências Médicas) Rijksuniversiteit Groningen, Davis-Groningen.
- 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.
- DELPINO, M. V., CASSATARO, J.; FOSSATI, C.A.; et al. *Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes Infect.*, v.8, p.1203–1208, 2006.
- DELPINO, M.V.; COMERCI, D.J.; WAGNER, M.A.; et al. Differential composition of culture supernatants from wild-type *Brucella abortus* and its isogenic virB mutants. *Arch. Microbiol.*, v.191, p.571–581, 2009.
- DELRUE, R.M.; DESCHAMPS, C.; LEONARD, S. et al.: A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol.*, v.7, p.1151–1161, 2005.
- 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.; ROLAN, H.G.; DE JONG, M.F.; et al. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J. Bacteriol.*, v.190, p.4427–4436, 2008.
- DEN HARTIGH, A.B.; SUN, Y.H.; SONDERVAN, D.; et al. Differential

- requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.72, p.143–149, 2004.
- DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet. Pathol.*, v.27, p.317–328, 1990.
- DORRELL, N.; GUIGUE-TALET, P.; SPENCER, S.; et al. Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of *Brucella suis*. *Microb. Pathog.*, v.27, n.1, p.1–11, 1999.
- EISENBERG, T.; HAMANN, H.; KAIM, U. et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, p.3753–3755, 2012.
- ESCHENBRENNER, M.; HORN, T.A.; WAGNER, M.A.; et al. Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M. *J. Proteome Res.*, v.5, p.1731–1740, 2006.
- 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.
- 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.
- FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D.; et al. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.64, n.8, p.248–250, 1987.
- FRANCO, M.P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; et al. Human brucellosis. *Lancet Infect. Diseases*, v.7, n.12, p.775–786, 2007.
- GAMAZO, C.; WINTER, A.J.; MORIYÓN, I.; et al. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, v.57, p.1419–1426, 1989.
- 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.
- GARZA, E.; FINAN, C.; IVERSON, A.; et al. Extension temperature of 60 °C required for PCR of large DNA fragments (>5 kb) from a low GC bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 27, p.449–451, 2011.
- GEE, J.M.; VALDERAS M.W.; KOVACH, M.E. et al. The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect. Immun.*, v.73 p.2873–2880, 2005.
- GIBSON, M.M.; PRICE, M.; HIGGINS, C.F. Genetic characterization and molecular cloning of the tripeptide permease (tpp) genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, v.160, p.122–130, 1984.
- GODFROID, F.; CLOECKAERT, A.; TAMINIAU, B.; et al. Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M. *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.

- GODFROID, J.; SCHOLZ, H.C.; BARBIER, T. et al. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev. Vet. Med.*, v.102, p.118–131, 2011.
- 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.
- GONZALEZ, P.; SAMUEL, J.; EPSTEIN, D.L.; et al. Increasing DNA transfer efficiency by temporary inactivation of host restriction. *Biotechniques*, v.26, p.457–460, 1999.
- GÖRG, A.; WEISS, W.; GÜNTHER S. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. v.4, p.3665–3685, 2004.
- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular multiplication. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.281–297, 2002.
- GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; VON EICHEL-STREIBER, C.; et al. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.44435–443, 2001.
- GUZMAN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A. et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.12375–12380, 2002.
- 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.
- HIGGINS, C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview, *Res. Microbiol.*, v.152, p.205–210, 2001.
- HILES, I.D.; GALLAGHER, M.P.; JAMIESON, D.J.; et al. Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.*, v.195, p.125–142, 1987.
- 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.
- 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.
- JUBIER-MAURIN, V.; RODRIGUE, A; LAYSSAC, M; et al. Identification of the nik gene cluster of *Brucella suis* : regulation and contribution to urease activity *J. Bacteriol.*, v.183, p.426–434, 2001..
- 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. Rev.*, v.16, p.65–78, 2003.
- KOVACH, M.E.; ELZER, P.H.; HILL, D.S.; et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, v.166, p.175–176, 1995.
- KULAKOV, Y. K.; P. G. GUIGUETALET; RAMUZ, M.R.; et al. Response of *Brucella suis* 1330 and *B. canis* RM6/66 to growth at acid pH and induction of an adaptive acid tolerance response. *Res. Microbiol.*, v.148, p.145–151, 1997.
- LAMONTAGNE, J.; BUTLER, H.; CHAVES-OLARTE, E.; et al., Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J. Proteome Res.*, v.6, p.1519–29, 2007.
- LAMONTAGNE, J.; FOREST, A.; MARAZZO, E.; et al., Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J. Proteome Res.*, v.8, p.1594–1609, 2009.
- LAMONTAGNE J, BÉLAND M, FOREST A, CÔTÉ-MARTIN A, NASSIF N, ET AL. Proteomics-based confirmation of protein expression and correction of annotation errors in the *Brucella abortus* genome. *BMC Genomics* v.11, p.1–10, 2010.
- LAPAQUE, N.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, p.60–66, 2005.
- LIN, J.; FICHT, T.A. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect. Immun.*, v.63, p.1409–1414, 1995.
- 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.
- MACEDO, A.A.; COSTA, E.A.; SILVA, A.P.C.; et al. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.151, p.294–302, 2013.
- MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.16, p.75–79, 1996.
- MANTEROLA, L.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; et al. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J. Bacteriol.*, v.187, p.5631–5639, 2005.
- 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 Infec.*, v.11, n.3, p.361–366, 2009.
- MARCHESINI, M.I.; HERRMANN, C.K.; SALCEDO, S.P. et al. In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell. Microbiol.*, v.13, p.1261–1274, 2011.
- 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).
- MARTÍNEZ-NÚÑEZ, C.; ALTAMIRANO-SILVA, P.; ALVARADO-GUILLÉN, F.; et al. The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV

- secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.*, v.192, p.5603–08, 2010.
- MARTÍN-MARTÍN, A.; CARO-HERNÁNDEZ, P.; ORDUÑA, A.; et al. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes Infect.*, v.10, p.706–710, 2008.
- MARTÍN-MARTÍN, A.; SANCHO, P.; TEJEDOR, C.; et al. Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Vet. J.*, v.189, p.103–105, 2011.
- MARTÍN-MARTÍN, A.; VIZCAÍNO, N.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes Infect.*, v.12, p.246–251, 2010.
- 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.
- MILLER, M.B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.55, p.165–199, 2001.
- MOL, J.P.S. Resposta de células trofoblásticas bovinas à infecção por *Brucella abortus*: uma abordagem proteômica. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2012. (Tese de Doutorado).
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.209–227, 2002.
- MORENO, E.; MORIYÓN, I. *The Prokaryotes*. p. 315–456 (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt, Eds.) New York, NY: Springer New York, 2006.
- MORIYÓN, I.; LOPEZ-GONI, I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int. Microbiol.*, v.1, p.19–26, 1998.
- NAIDER, F.; BECKER, J.M. Multiplicity of oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, v.122, p.1208–1215, 1975.
- 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.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, v.6, p.91–99, 2006.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MÉRESSE, S.; PARTON, R.G.; et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non-professional phagocytes. *Infect. Immun.*, v.66 p. 5711–5724, 1998a.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect.*, v.2, p.829–835, 2000.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; et al. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-

- like compartments. *Infect. Immun.*, v.66, p.2387–2392, 1998b.
- POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; SANTOS, R. L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Épizooties*, v.32, p. 105–115, 2013.
- PORTE, F.; LIAUTARD, J.P.; KÖHLER, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.67, p.4041–4047, 1999.
- PORTE, F.; NAROENI, A.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.71, p.1481–1490, 2003.
- RAMBOW-LARSEN, A.; RAJASHEKARA, G.; PETERSEN, E.; et al. Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J. Bacteriol.*, v.190, p.3274–3282, 2008.
- REDWOOD, D.W.; CORBEL, M.J. Interaction of *Brucella ovis* with ovine tissue extracts. *Vet. Rec.*, v.113, n.10, p.220, 1983.
- RICHARME, G.; CALDAS, T.D. Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.15607–15612, 1997.
- 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.
- RITTIG, M.G.; KAUFMANN, A.; ROBINS, A.; et al. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes v.74, p.1045–1055, 2003.
- 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.
- ROOP, R.M.; GAINES, J.M.; ANDERSON, E.S.; et al; Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol.*, v.198, n.4, p.221–238, 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.
- ROSSETTI, C.A.; GALINDO, C.L.; LAWHON, S.D.; et al. *Brucella melitensis* global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding *Brucella*: host initial interactions. *BMC Microbiol.*, v.9, n.81, 2009.
- ROUOT, B.; MARIUS, C.; MENANTEAU P.; et al Production of the Type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect. Immun.*, v.71 p.1075–1082, 2003.
- SA, J.C.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; et al. The virB-encoded type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice. *Vet Microbiol.*, v.159, p.130–140, 2012.

- SALCEDO, S.P.; CHEVRIER, N.; LACERDA, T.L.; et al. Pathogenic *Brucellae* replicate in human trophoblast. *J. Infec. Dis.*, v.207, p.1075–1083, 2013.
- SANGARI, F.J.; CAYÓN, A.M.; SEOANE, A.; et al. *Brucella abortus ure2* contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC Microbiol.*, v.10, n.107, p.1–12, 2010.
- SANTOS, R. L.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M.; et al. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p. 759–764, 2013.
- SANTOS, R.L.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.42–56, 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.; 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, 2008a.
- SCHOLZ, H.C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.60, p.801–808, 2010.
- SCHOLZ, H.C.; PFEFFER, M.; WITTE, A.; et al. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the *recA* gene. *J Med Microbiol.*, v.57, p.64–71, 2008b.
- 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.
- SELEEM, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol.*, v.140, p.392–398, 2010.
- SIEIRA R. Regulation of virulence in *Brucella*: an eclectic repertoire of transcription factors defines the complex architecture of the *virB* promoter. *Rev. Future Microbiol.*, v.8, n.9, p.1193–1208, 2013.
- SIEIRA, R.; AROCENA, G.M.; BUKATA, L.; et al. Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates *virB* expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *J. Bacteriol.*, v.192, p.217–24, 2010.
- SIEIRA, R.; COMERCI, D.J.; PIETRASANTA, L.I.; et al. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. *Mol. Microbiol.*, v.54, p.808–822, 2004.
- 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 replication. *J. Bacteriol.*, v.182, p.849–855, 2000.
- SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; BORGES, A.M.; et al. Brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.1–12, 2005.
- SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A.; et al. Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect. Immun.*, v.79 p.1706–1717, 2011.

- SIMMONS, G.C.; HALL, W.T.K. Epididymitis in rams. *Aust. Vet. J.*, v.29, p.33–40, 1953.
- 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. Dis. J.*, v.9, n.4, p.485–488, 2003.
- SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDA, J.; GRILLO, M.J.; et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.29, p.125–138, 1998.
- SOWA, B.A.; KELLY, K.A.; FICHT, T.A.; et al. Virulence associated proteins of *Brucella abortus* identified by paired two-dimensional gel electrophoretic comparisons of virulent, vaccine and LPS deficient strains. *Appl. Theor. Electrophor.*, v.3, p.33–40, 1992.
- STABEL, T.J.; SHA, Z.; MAYFIELD, J.E. Periplasmic location of *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase. *Vet. Microbiol.*, v.38, p.307–314, 1994.
- STARR, T.; CHILD, R.; WEHRLY, T.D.; et al. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe*, v.11, p.33–45, 2012.
- STARR, T.; NG, T.W.; WEHRLY, T.D.; et al. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, v.9, p.678–694, 2008.
- SUN, Y.H.; DEN HARTIGH, A.B.; SANTOS, R.L.; et al. *virB*-mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages. *Infect. Immun.*, v.70, n.9, p.4826–4832, 2002.
- SUN, Y.H.; ROLAN, H.G.; DEN HARTIGH, A.B.; et al. *Brucella abortus virB12* is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. *Infect. Immun.*, v.73, p.6048–6054, 2005.
- TAM, R.; SAIER, M.H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.*, v.57, p.320–346, 1993.
- TANNU, N.S.; HEMBY, S.E. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat. Protoc.*, v.1, n.4, p.1732–1742, 2006.
- TEIXEIRA-GOMES A.P.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S. Characterization of heat, oxidative and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, v.68, p.2954–2961, 2000.
- TEIXEIRA-GOMES, A.; CLOECKAERT, A.; BÉZARD, G.; et al. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using 2D electrophoresis and immunoblotting. *Electrophor.*, v.18, p.1491–1497, 1997.
- 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.
- 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.12503–505, 2002.

- TSOLIS, R.M.; O'CALLAGHAN, D. The *Brucella* virB type IV secretion system. In: LÓPEZ-GOÑI, C.; O'CALLAGHAN, D. (Eds) *Brucella Molecular Microbiology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p.211–223, 2012.
- 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.
- UZUREAU, S.; LEMAIRE, J.; DELAIVE, E.; et al. Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M research articles. *J. Proteome Res.*, v.9, p.3200–3217, 2010.
- VAN DER DOES, C.; TAMPÉ, R. How do ABC transporters drive transport? *Biol. Chem.*, v.385, p.927–933, 2004.
- VAN DER HEIDE, T.; POOLMAN, B. ABC transporters one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Reports*, v.3, p.938–943, 2002.
- 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.; 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.
- VERGER, J.M.; GRIMONT F.; GRIMONT P.A.D.; et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.35, p.292–295, 1985.
- VIADAS, C.; RODRIGUEZ, M.C.; SANGARI, F.J.; et al. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* v.5, e10216, 2010.
- VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, v.64, p.3744–51, 1996.
- WAGNER, M.A.; ESCHENBRENNER, M.; HORN, T.A. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics*, v.2, p.1047–1106, 2002.
- WANG, Y.; CHEN, Z.; QIAO, F.; et al. The type IV secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. *FEMS Microbiol. Letters*, v.303, p.92–100, 2010.
- WANG, Y.; CHEN, Z.; QIAO, F.; et al. Comparative proteomics analyses reveal the virB of *B. melitensis* affects expression of intracellular survival related proteins. *PLoS ONE*, v.4, e5368, 2009.
- WEEKS, J.N.; GALINDO, C.L.; DRAKE, K.L.; et al. *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol.*, v.10, n.167, p.1–20, 2010.
- WU, W.W.; WANG, G.; BAEK, S.J.; et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J. Proteome Res.*, v.5, n.3, p.651–658, 2006.
- 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.; 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.*, v.145, p.158-164, 2010.

ZYLBERMAN, V.; KLINKE, S.; HAASE, I.; et al. Evolution of vitamin B2 biosynthesis: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthases of *Brucella*. *J. Bacteriol.*, v.188, p.6135– 6142, 2006.