

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

**O papel de macrófagos na imunidade inata contra a brucelose
bovina em zebuínos e taurinos
(Dissertação)**

AURICÉLIO ALVES DE MACÊDO

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012**

AURICÉLIO ALVES DE MACÊDO

**O PAPEL DE MACRÓFAGOS NA IMUNIDADE INATA CONTRA A BRUCELOSE
BOVINA EM ZEBUÍNOS E TAURINOS.**

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

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Renato de Lima Santos

Co-orientadora: Tatiane Alves da Paixão

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012

M141c Macêdo, Auricélio Alves de, 1983-
O papel de macrófagos na imunidade inata contra a brucelose bovina em zebuínos e taurinos / Auricélio Alves de Macêdo. – 2012.
44 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos
Co-orientadora: Tatiane Alves da Paixão
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Brucelose em bovino – Teses. 3. Brucella abortus – Teses. 4. Macrófagos – Teses. 5. Imunidade – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Paixão, Tatiane Alves da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

CDD – 636.089 695 7

Dissertação defendida em 03 de fevereiro de 2012, com comissão examinadora constituída por:

Prof. Renato de Lima Santos
(Orientador)

Prof. Olindo Assis Martins Filho

Prof. Ricardo Gonçalves

Dra. Érica Azevedo Costa

Dedico ao meu bom Deus, nosso Senhor... E a minha família, por me propiciaram uma vida digna... À Ana Patrícia, por estar presente em todos os momentos da minha vida, assim como a toda sua família.

“Não há vento favorável para aquele que não sabe para onde vai” Lucius Annaeus Seneca (4 a.C.-65 d.C.).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me estender a mão nos momentos difíceis e me dar coragem e sabedoria para sempre me reerguer e seguir em frente. Peço perdão pelos momentos em que fraquejei...

Aos meus pais João Francisco de Macêdo e Maria Gracinete Alves de Lima, por me proporcionarem uma excelente criação, sempre mostrando os valores da honestidade...

À todos os meus familiares, avós, tios, irmãos, sobrinhos e primos pelo apoio incondicional...

À Ana Patrícia, anjo que Deus colocou em minha vida e a toda à sua família, pelo carinho e cuidado...

Ao Prof. Renato de Lima Santos, pela orientação, pelo voto de confiança e pela oportunidade de crescimento profissional, à quem serei grato por toda a vida...

À Prof^a. Tatiane Alves da Paixão pela co-orientação e pela preocupação em sempre mostrar o caminho para o crescimento profissional...

À Dra. Érica Azevedo Costa pela co-orientação, pelo exemplo de pessoa e caráter, a quem devo grande parte da realização deste trabalho...

À meus eternos orientadores Prof^a Ana Lúcia Abreu Silva e Prof. Fábio Henrique Andrade, pelo carinho, amizade e pelo voto de confiança...

Aos professores do setor de patologia Prof. Ernane Fagundes do Nascimento, Prof^a Rogéria Serakides, Prof^a Natália Ocarino, Prof^a Roselene Ecco e Prof. Roberto Guedes, pelos ensinamentos durante o Mestrado...

Ao Prof. Sérgio Costa (ICB/UFMG) e seus alunos, Patrícia e Leonardo, pela ajuda na realização dos ensaios de óxido nítrico...

Aos colegas do laboratório de Patologia Molecular e Bacteriologia Aplicada pela receptividade e carinho...

À Fazenda Paineiras – Sete Lagoas/MG, em especial, ao Sr. Zé de Bento e à Granja da Itambé – Sete Lagoas/MG, em especial ao Dr. Vinícius e ao Dr. Leandro, por permitirem a realização da coleta de material, assim como pela receptividade e pelo carinho durante os momentos que estive em suas propriedades...

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudos concedida durante o Mestrado...

À Escola de Veterinária - UFMG, por ter proporcionado uma excelente formação...

À todos que participaram direta ou indiretamente, na realização desse trabalho...

Meu sincero muito obrigado!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DE LITERATURA	
Brucelose.....	13
Brucelose bovina.....	14
Sobrevivência intracelular de <i>Brucella abortus</i>	15
Imunidade inata na infecção por <i>Brucella abortus</i>	16
Resistência natural a patógenos.....	17
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
RESULTADOS	
Invasão e sobrevivência da cepa parental e mutante $\Delta dhbCEBA$ de <i>Brucella abortus</i> em macrófagos bovinos, em condições normais ou sob quelatação de ferro intralisossomal.....	26
Expressão gênica de <i>Nramp1</i> , <i>TNF-α</i> , <i>iNOS</i> , <i>IL-10</i> , <i>IL-12</i> e <i>IL-4</i> durante a infecção por <i>Brucella abortus</i> em macrófagos bovinos.....	29
Produção de NO em macrófagos derivados de monócitos de bovinos Nelore e Holandês após infecção por <i>Brucella abortus</i>	31
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de genes e <i>primers</i> para RT-qPCR em tempo real.....	23
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coleta de sangue bovino da veia jugular (A), diluição em PBS-citrato (B), deposição em coluna de Percoll (C), centrifugação (D), ressuspensão em meio RPMI (E) e incubação em estufa a 37° C em 5% CO ₂ (F).....	25
Figura 2 – Invasão e sobrevivência intracelular da cepa parental de <i>B. abortus</i> e da cepa mutante Δdhb CEBA de <i>B. abortus</i> em macrófagos bovinos derivados de monócitos do sangue periférico com ou sem quelação de ferro intralisossomal: macrófagos de Nelore e Holandês foram desafiados com a cepa parental 2308 de <i>B. abortus</i> e mutante Δdhb CEBA em condições normais (A) e comparados sob quelação de ferro (B e C). Os dados representam média e erro padrão (n=7). * indica diferença estatística significativa entre as cepas parental e mutante com ou sem quelação de ferro em macrófagos da mesma raça. # indica diferença estatística significativa entre a cepa parental ou mutante com ou sem quelação de ferro intralisossomal em macrófagos de Nelore e Holandês.....	27
Figura 3 – Micrografias eletrônicas de transmissão de macrófagos derivados de monócitos infectados com <i>B. abortus</i> de Holandês (A) e Nelore (B) 48 horas após a infecção. As ampliações são indicadas no lado inferior direito.....	28
Figura 4 – Expressão de <i>Nramp1</i> , <i>iNOS</i> , <i>TNF-α</i> , <i>IL-10</i> , <i>IL-12</i> e <i>IL-4</i> em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de Nelore (n=10) e Holandês (n=10) em 12 (A) e 24 horas pós-infecção (B) em comparação aos controles não infectados. Colunas representam médias e erro padrão. Todos os dados sofreram transformação logarítmica antes da análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t de Student. Diferença significativa entre os dados de Nelore e Holandês está indicada por asteriscos (**p<0.001; ***p<0.0001).....	30
Figura 5 – Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos bovinos infectados com <i>B. abortus</i> . A concentração de NO foi determinada no sobrenadante da cultura de macrófagos de Nelore (n=6) e Holandês (n=6) não infectados (n.i.), como controle negativo, ou desafiados com <i>B. abortus</i> , utilizando o reagente de Griess (μ M). <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhimurium inativada pelo calor foi usada como controle positivo. Colunas representam médias e desvio padrão. Diferença significativa entre os dados de Nelore e Holandês está indicada por asteriscos (*p<0.01; **p<0.001). # indica diferença significativa entre o controle não infectado.....	32

RESUMO

Brucelose é uma das mais importantes doenças zoonóticas no mundo. Considerando sua estrita natureza zoonótica, entender a patogênese e a imunidade de *Brucella* spp. no hospedeiro animal natural é essencial para prevenir infecções humanas. Resistência natural contra brucelose tem sido demonstrada em bovinos e é associada com a habilidade de macrófagos prevenir a replicação intracelular de *Brucella abortus*. A identificação de raças que são resistentes a *B. abortus* pode contribuir para o controle e erradicação de brucelose bovina. O objetivo deste estudo foi comparar macrófagos de Nelore (*Bos taurus indicus*) ou Holandês (*Bos taurus taurus*) quanto a sua resistência a infecção por *B. abortus*. Macrófagos de Nelore foram significativamente mais eficientes em controlar o crescimento de *B. abortus* quando comparados a macrófagos de Holandês, mesmo sob condições de restrição intralisossomal de ferro. Além disso, macrófagos de Nelore tiveram altos níveis de transcrição de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e TNF- α em 12 horas pós-infecção (hpi), além de altos níveis de IL-12 em 24 hpi quando comparado aos macrófagos de Holandês. Inversamente, macrófagos de Holandês tiveram maiores níveis de transcrição de IL-10 as 24 hpi. Macrófagos de Nelore também geraram mais óxido nítrico (NO) em resposta a infecção por *B. abortus* quando comparado a macrófagos de Holandês. Em conclusão, macrófagos de Nelore são mais eficientes em controlar replicação intracelular de *B. abortus*, sugerindo que é provável que a raça Nelore tenha um maior grau de resistência natural a brucelose do que a raça Holandesa.

Palavras-Chave: *Brucella abortus*, bovino, macrófago, imunidade inata.

ABSTRACT

Brucellosis is one of the most important zoonotic diseases in the world. Considering its strict zoonotic nature, understanding of the pathogenesis and immunity of Brucella spp. in natural animal hosts is essential to prevent human infections. Natural resistance against brucellosis has been demonstrated in cattle, and it is associated with the ability of macrophages to prevent intracellular replication of Brucella abortus. Identification of breeds that are resistant to B. abortus may contribute for controlling and eradicating brucellosis in cattle. This study aimed to compare macrophages from Nelore (Bos taurus indicus) or Holstein (Bos taurus taurus) regarding their resistance to B. abortus infection. Macrophages from Nelore were significantly more efficient in controlling intracellular growth of B. abortus when compared to Holstein macrophages even under intralysosomal iron restricting conditions. Furthermore, Nelore macrophages had higher transcription levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF- α at 12 h post-infection (hpi) and higher levels of IL-12 at 24 hpi when compared to Holstein macrophages. Conversely, Holstein macrophages had higher levels of IL-10 transcripts at 24 hpi. Macrophages from Nelore also generated more nitric oxide (NO) in response to B. abortus infection when compared to Holstein macrophages. In conclusion, cultured Nelore macrophages are more effective in controlling intracellular replication of B. abortus, suggesting that Nelore cattle is likely to have a higher degree of natural resistance to brucellosis than Holstein.

Keywords: *Brucella abortus*, Cattle, Macrophage, Innate immunity.

INTRODUÇÃO

Brucelose é uma relevante zoonose global que é causada pelo patógeno intracelular facultativo do gênero *Brucella* (Young, 1983). *Bucella abortus* é o mais importante agente etiológico da brucelose bovina, mas esse organismo também pode infectar búfalos, camelos, veados, cavalos, caprinos, ovinos e o homem (Enright et al., 1984; Kudi et al., 1997). Brucelose no bovino é associada com diminuição da produção de leite, aumento do número de células somáticas no leite, aborto no terço médio ou final da gestação, nascimento de bezerros fracos e metrite pós-parto (Emminger and Schalm, 1943; Xavier et al., 2009). Em touros, *B. abortus* pode causar orquite, que é frequentemente associada com epididimite e vesiculite (Eaglesome and Garcia, 1992).

Resistência natural pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em evitar o desenvolvimento da doença após infecção sem prévia exposição ao agente infeccioso (Templeton et al., 1988). Na brucelose, vários fatores incluindo o número de receptores superficiais celulares envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados com *Brucella*, maturação e ativação de macrófagos e células dendríticas, peptídeos antimicrobianos e produção de citocinas podem influenciar a resistência natural (Adams and Schutta, 2010). Neste contexto, a habilidade do macrófago em prevenir o crescimento intracelular *B. abortus* tem sido extensivamente usado como um indicador fenotípico de resistência contra brucelose (Campbell and Adams, 1992; Qureshi et al., 1996; Martínez et al., 2010; Rossetti et al., 2011). Resistência natural em bovinos tem sido associada com o *Natural Resistance-associated Macrophage Protein 1* (Nramp1), que é um transportador de cátions divalentes que diminui a disponibilidade de ferro no fagolisossomo

(Forbes and Gros, 2003). Assim, neste estudo, foi usado uma cepa mutante $\Delta dhbC$ que é deficiente na aquisição de ferro (Bellaire et al., 2003a).

Estudos prévios tem comparativamente acessado resistência natural em raças Zebu (*Bos taurus indicus*) e Taurina (*Bos taurus taurus*). Tem sido demonstrado que o gado Zebu é mais resistente a babesiose (Parker et al., 1985; Bock et al., 1999), carrapato (Rechav and Kostrzewski, 1991; Wambura et al., 1998) e nematodos (Peña et al., 2000), quando comparado ao gado Europeu. Adicionalmente, a raça zebuína Nelore é mais resistente ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Babesia bovis* quando comparado a outras raças zebuínas.

O controle da brucelose bovina é baseada na vacinação, inquéritos sorológicos, abate de animais infectados e rigoroso manejo sanitário. Entretanto, essas medidas combinadas podem não suficientes para erradicar a doença (Rogers et al., 1989; Martínez et al., 2010). Além disso, diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de identificar marcadores de resistência à brucelose bovina. No entanto, não há dados conclusivos na associação entre fenótipos e genótipos resistentes para brucelose bovina, nem associação entre marcadores fenotípicos de resistência à brucelose bovina ligada a raça (Adams and Templeton, 1998; Barthel et al., 2001; Paixão et al., 2007, 2012; Martínez et al., 2010).

Considerando que a brucelose é uma das mais importantes doenças zoonóticas no mundo como também sua estrita natureza zoonótica, entender a patogênese e a imunidade de *Brucella* spp. no hospedeiro animal natural é essencial para prevenir infecções humanas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar resistência natural contra *B. abortus* em raças Zebu (Nelore) e Taurina (Holandês).

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Brucelose e o gênero *Brucella*

A brucelose é uma enfermidade de distribuição mundial com uma média estimada de 500.000 novos casos humanos a cada ano, segundo a Organização Mundial de Saúde (Mufinda e Klein, 2011). As regiões do mundo que são consideradas de mais alto risco compreendem América do Sul e Central, Bacia do Mediterrâneo, Europa oriental, Ásia, África, Caribe e Oriente Médio (Taleski et al., 2002) e em países como Israel, Kuwait, Arábia Saudita, Brasil e Colômbia. A brucelose é considerada uma doença re-emergente, sendo considerada a zoonose de maior importância em todo o mundo (Trujillo et al., 1994; Corbel et al., 2006; Pappas et al., 2006).

Bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos, Gram-negativos, intracelulares facultativos, com capacidade de persistirem e replicarem dentro dos macrófagos, medindo 0,5 a 0,7µm de largura por 0,5 a 1,5µm de comprimento, aparecendo com maior frequência isolados ou, por vezes, aos pares ou em pequenas cadeias, não formam esporos nem cápsulas verdadeiras, são invariavelmente imóveis e aflageladas. São aeróbias e não crescem em condições de anaerobiose estrita, mas muitas amostras, especialmente algumas biovariedades de *B. abortus* e *B. ovis*, exigem a suplementação de CO₂ para crescimento. São quimiorganotróficos, catalase e oxidase positivos (exceto *B. neotomae* e *B. ovis* que são oxidase-negativas), reduzem o nitrato a nitrito (exceto *B. obis*) e atividade proteolítica não é uma característica marcante. A produção de urease é consistentemente alta em *B. suis* e *B. canis*, variável nas outras espécies e fraca ou

negativa na *B. ovis* (Corbel e Brinley-Morgan, 1984).

Infectam diferentes hospedeiros preferenciais e são capazes de causar doença em diferentes espécies animais, incluindo humanos (Xavier et al., 2009). Seis espécies foram inicialmente reconhecidas dentro do gênero e nomeadas conforme seu hospedeiro preferencial, embora apresentem alto grau de homologia genética entre si. Cada uma dessas espécies é adaptada a um hospedeiro mamífero específico, mas não exclusivo (Moreno e Moriyón, 2001). Quatro das seis espécies de *Brucella* – *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos) e *B. canis* (cães) – são capazes de infectar o homem em condições naturais (Hartigan, 1997). Não há relatos da infecção humana por *B. neotomae* (Rato do deserto, *Neotomae lepida*) e *B. ovis* (ovinos). Atualmente, três espécies foram incluídas no gênero *Brucella* – *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, isoladas de mamíferos marinhos, com hospedeiros preferenciais cetáceos (golfinhos e baleias) e pinípedes (focas e leões-marinhos), respectivamente (Foster et al., 2007) e *B. microti* isolada de um roedor silvestre (*Microtus arvalis*) (Scholz et al., 2008). Em babuínos, foi relatada a existência de um novo isolado de *Brucella*, ainda não classificada (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009). Em pacientes humanos foi isolada *Brucella inopinata*, primeiramente de implante mamário (Scholz et al., 2010) e, posteriormente, de uma biópsia pulmonar (Tiller et al., 2010).

Em humanos, a brucelose é considerada uma doença debilitante caracterizada por febre, mal-estar, artrite, osteomielite, endocardite ou meningoencefalite (Paixão et al., 2009). O consumo de leite e derivados não pasteurizados é a principal

forma de transmissão da doença para o homem. Contato direto com animais, fetos abortados, secreções uterinas e carcaças de animais portadores durante o abate também são formas comuns de transmissão para grupos de risco, que inclui veterinários, vaqueiros e magarefes (Young, 1983; Corbel, 1997). Acidentes com amostras vacinais ou manipulação laboratorial da bactéria são formas menos freqüentes de transmissão (Silva et al., 2005).

Brucelose bovina

A *B. abortus*, principal agente etiológico da brucelose bovina, desenvolveu evolutivamente mecanismos de sobrevivência no hospedeiro por períodos prolongados, proporcionando a permanência e a transmissão do agente na população (Silva et al. 2005). No Brasil, a brucelose bovina por *B. abortus* é a infecção com maior prevalência causada pelo gênero *Brucella* (Poester et al., 2006).

A *B. abortus* assim como as outras três espécies clássicas de *Brucella* (*B. melitens*, *B. abortus* e *B. suis*) apresenta morfologia lisa de sua colônia, devido à cadeia O de polissacarídeo (LPS) de sua parede celular (Bundle et al., 1987). O LPS é um componente importante para a integridade funcional e estrutural da membrana externa da *Brucella*. A caracterização do fenótipo liso ou rugoso da *Brucella* depende da presença ou ausência da cadeia O de polissacarídeo na sua superfície, respectivamente (Lapaque et al., 2005). Apesar de não determinar transtorno reprodutivo como a *B. abortus*, a *B. melitensis* e *B. suis* são espécies de *Brucella* capazes de infectar bovinos (Verger, 1985; Ewalt et al., 1997). *B. suis* pode comprometer programas de controle e erradicação da brucelose, uma vez que há

produção de anticorpos ao longo da infecção, estes reconhecidos nos testes sorológicos de forma semelhante à infecção por *B. abortus* (Rogers et al., 1989). Exames laboratoriais são necessários para o diagnóstico de animais infectados no rebanho. Apesar de o diagnóstico definitivo ser feito por isolamento microbiológico, a sorologia é a técnica mundialmente utilizada para identificação de rebanhos infectados (Nielsen, 2002; Poester et al., 2005). A infecção e manifestação clínica dependem da idade, período reprodutivo do animal, estado imunológico, resistência natural, via de infecção, dose infectante e virulência da amostra presente no rebanho (Nicoletti, 1980; Adams, 2002).

Em fêmeas bovinas adultas gestantes, a infecção por *B. abortus* provoca quadro clínico caracterizado por aborto no último trimestre de gestação (Samartino e Enright, 1992). Após o aborto, as fêmeas podem permanecer sem manifestações clínicas da enfermidade ou podem abortar em gestações subseqüentes (Wilesmith, 1978). O aborto causado por *B. abortus* está associado à placentite necro-hemorrágica neutrofílica e a lesões fetais como pneumonia intersticial, pleurite e pericardite fibrinosas (Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010).

Apesar de existirem variações individuais na manifestação das lesões (Payne, 1959), a vaca gestante apresenta aumento de volume de linfonodos próximos ao local de entrada do agente, evoluindo para linfadenite aguda focal (Kennedy e Miller, 1993). No útero gestante, as principais alterações macroscópicas são a presença de quantidade variável de exsudato fétido, amarelo-amarronzado, floculento, contendo material necrótico (Silva et al., 2005; Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al.,

2010). Na placenta, alguns placentomas podem apresentar-se normais enquanto outros podem estar necróticos e/ou hemorrágicos com grande quantidade de colônias bacterianas (Payne, 1959; Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010). Microscopicamente, as lesões são caracterizadas por hiperplasia de folículos linfóides e em seguida infiltração de neutrófilos e hemorragia, resultando em linfadenite multifocal, que evolui para um processo inflamatório granulomatoso (Payne, 1959; Meador et al., 1988; Meador et al., 1989). No útero observa-se infiltração de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e alguns eosinófilos e necrose, caracterizando uma endometrite neutrofílica e necrotizante difusa (Carvalho-Neta et al., 2010).

A transmissão da brucelose bovina ocorre principalmente quando os animais susceptíveis entram em contato com membranas fetais contaminadas, fetos abortados ou secreções uterinas (Nicoletti, 1980) e o controle e erradicação dessa doença dependem fundamentalmente de medidas sanitárias como prevenção da exposição de animais susceptíveis à *B. abortus*, restrição das áreas de parição das vacas, separação dos animais infectados e aumento da resistência da população bovina à infecção. A sistematização de tais medidas torna-se importante para o sucesso do controle e erradicação da enfermidade (Lage et al., 2005).

Sobrevivência intracelular da *Brucella abortus*

Mecanismos de resistência ao ambiente acidificado intracelular e a inibição da fusão do lisossomo ao fagossomo são as principais características que determinam a sobrevivência de *B. abortus* no interior de fagócitos profissionais ou células não

fagocíticas (Pizarro-Cerdá, 1998; Porte et al., 1999; Wang et al., 2001).

Uma característica importante e inerente à *B. abortus* é a sua capacidade de infectar fagócitos e células não fagocíticas *in vivo* e *in vitro*. Após ser internalizada por fagócitos, a bactéria pode ser destruída no interior de fagolisossomos ou sobreviver nestes compartimentos e multiplicar-se em sítios intracelulares de multiplicação. A opsonização no momento da internalização a torna a *B. abortus* mais susceptível a ação bactericida dos macrófagos, nesse caso, a maioria das bactérias internalizadas é destruída no interior de fagolisossomos antes de atingir os sítios de multiplicação intracelulares. Amostras virulentas de *B. abortus* alteram os mecanismos de maturação dos fagossomos, bloqueiam sua fusão com os lisossomos, impedindo assim a degradação bacteriana no interior do fagócito (Gorvel e Moreno, 2002). A *B. abortus* tem a capacidade de alterar o tráfego intracelular e maturação do fagolisossomo, prevenindo a aquisição de marcadores lisosomais e direcionando-se para um compartimento com marcadores de retículo endoplasmático rugoso, onde encontra ambiente plenamente favorável à sua replicação intracelular. Este mecanismo é fortemente dependente do sistema de secreção do tipo IV codificado pelo operon *virB* (Celli et al., 2003).

A explosão oxidativa é um mecanismo desenvolvido por fagócitos para eliminação de patógenos (Serafino et al., 2007) e envolve duas enzimas importantes para tal eliminação: NADPH oxidase e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). Esse processo ativa a hexose monofosfato que culmina com a ativação dos sistemas bactericidas dependentes de oxigênio. Assim, são formados espécies reativas de

oxigênio (ROS) como o anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^- e $\cdot OH$). Além desses, a explosão oxidativa ativa outros sistemas como o óxido nítrico (NO) e a mieloperoxidase (MPO) (Abbas et al., 2003).

O NO é derivado da L-arginina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS), para qual são identificadas três isoformas: a induzível (iNOS), endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), sendo as duas últimas constitutivas e apenas a primeira isoforma envolvida na produção de óxido nítrico durante a atividade antimicrobiana (López-Urrutia et al., 2000). O sistema NO interage com radicais intermediários de O_2 produzidos durante a explosão oxidativa dando origem a radicais intermediários de nitrogênio (RNI). Tais radicais têm grande capacidade oxidante, inativando assim os sistemas enzimáticos das bactérias fagocitadas, levando-as a morte. A mieloperoxidase, na presença de peróxido de hidrogênio, oxida íons cloro e iodo, destruindo a bactéria por halogenação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Abbas et al., 2003).

Células apresentadoras de antígenos (APCs) ativadas, como macrófagos, por exemplo, secretam citocinas imunomoduladoras como interleucina 6 (IL-6), IL-12 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α). Estas, após a ativação dos macrófagos, têm a importante função de recrutar neutrófilos e monócitos, além de participarem de maneira decisiva na ativação e diferenciação de linfócitos T e B. A IL-12 é uma citocina funcional que tem a capacidade de estimular os linfócitos T a secretarem interferon- γ (INF- γ), principal ativador de macrófagos (Ko e Splitter, 2003). Assim, estas citocinas desencadeiam um papel importante durante

a resposta inflamatória, resposta imune inata e modulação da resposta imune adquirida.

Imunidade inata na infecção por *Brucella abortus*

A imunidade inata é um fator imprescindível no controle inicial do número de bactérias, além de auxiliar no melhor desenvolvimento da imunidade adquirida (revisado por Golding et al., 2001; Ko e Splitter, 2003). Existem vários mecanismos de resposta imune do hospedeiro bovino durante a infecção por *B. abortus*, envolvendo tanto imunidade inata e adquirida. Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são as principais células envolvidas na imunidade inata, tornando-se necessário o reconhecimento da *B. abortus* pela superfície externa dessas células para que seja ativada e executada sua função microbicida (Weiss et al., 2005). A interação da *Brucella* com macrófagos ou células dendríticas durante os primeiros estágios da infecção pode influenciar na natureza da resposta imune que é altamente dependente da indução de citocinas (Zhan et al., 1996). Essa interação inicial é mediada pelos PRRs (receptores de reconhecimento padrão), sendo a *Brucella* reconhecida pelos TLR-2, 4 e 9 (Barquero-Calvo et al., 2007).

Os PRRs compreendem a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esse reconhecimento ativa uma cascata de sinalizações que culmina com a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (revisado por Paixão et al., 2009).

Os TLRs (*Toll like receptors*) são os principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de *B. abortus* por fagócitos. Componentes da imunidade inata, os TLRs são ativados por padrões moleculares associados aos patógenos como LPS, lipoproteína, DNA bacteriano, reconhecidos por TLR 4, TLR 2 e TLR 9, respectivamente (Weiss et al., 2005).

O reconhecimento do LPS, o principal componente da membrana externa de *B. abortus*, é mediado pelo CD14. Entretanto o CD14 se associa principalmente ao TLR4 para transdução do sinal. Estudos relacionados a esses receptores relatam que há o envolvimento do TLR2 junto ao TLR4 no reconhecimento da *Brucella*, mesmo que através de outros componentes bacterianos. Além dos receptores, existem moléculas adaptadoras, como o fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), que também participam do reconhecimento e ativação de macrófagos. O Myd88 funciona como um transdutor do sinal desencadeado pelos TLRs, favorecendo o desenvolvimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente à infecção por *B. abortus* (Weiss, et al., 2005).

A imunidade celular durante a infecção por *B. abortus* nos bovinos é caracterizada pela ativação antígeno-específica de linfócitos T auxiliar (CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). A bactéria é fagocitada por macrófagos, que secretam IL-12, citocina responsável pela diferenciação dos linfócitos T auxiliar subtipo 1 (Th1) que produzem INF γ , que por sua vez ativam a função bactericida dos macrófagos (Splitter et al., 1996; Oliveira et al., 2002).

A resposta imune protetora depende da ativação de linfócitos T CD8⁺ (Oliveira et al., 1998). Os linfócitos T citotóxicos

desempenham papel importante na destruição de macrófagos infectados por meio de mecanismos citotóxicos, além de secretarem INF γ (Oliveira et al., 2002, Wyckoff III, 2002). A ativação de linfócitos B e a produção de anticorpos favorecem a opsonização, mecanismo que facilita a fagocitose (Ko e Splitter, 2003).

Outras citocinas além da IL-12 e do INF γ também podem desempenhar uma função importante na resposta imunológica à brucelose, como por exemplo, o TNF- α e a IL-1, que auxiliam no controle da taxa de replicação da *Brucella* no interior de fagócitos (Ko e Splitter, 2003), assim como a IL-10 que limita a resposta inflamatória e está associada à persistência da infecção em camundongos (Golding et al., 2001).

Resistência natural a patógenos

A capacidade que um animal possui de resistir a uma enfermidade quando exposto ao agente infeccioso sem qualquer exposição prévia é denominada de resistência natural (Templeton et al., 1988).

Estudos realizados em camundongos demonstraram a existência de genes que controlam o processo de resistência natural e grande parte desses genes funcionais nesta espécie podem ser também funcionais na espécie humana e nos animais domésticos (Adams e Templeton, 1998).

Estudos com camundongos demonstraram que genes no cromossomo 1 controlam a resistência natural a patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* - bacilo de Bilié-Calmette-Guérin (Gros et al., 1981), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (Lissner et al., 1983) e *Leishmania donovani* (Bradley et al., 1979). Tais genes foram identificados como locus *Bcg*, *Ity* e *Lsh*, respectivamente.

Posteriormente, demonstrou-se que tais loci tratavam-se de apenas um único gene o *Nramp1*.

O *Nramp1* (*Natural resistance associated macrophage protein 1*), hoje renomeado como *Slc11a1* (*Solute carrier family 11 member 1*) pertence a uma família de proteínas conservadas na evolução, homólogo entre mamíferos, insetos e bactérias, demonstrando ter importância em todas os tipos de organismos (revisado por Skamene et al., 1998). A proteína *Nramp1* tem a função de transportar cátions divalentes como ferro (Fe^{2+}) e manganês (Mn^{2+}), dependente do pH (Forbes e Gros, 2003), além de estar envolvida em efeitos pleiotrópicos, proporcionando a estabilização do RNA mensageiro de citocinas e modulando o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (revisado por Blackwell e Searle, 1999).

A expressão da proteína *Nramp1* está relacionada a várias características fagocitárias que proporcionam a eliminação de patógeno intracelular. A inibição do crescimento bacteriano, facilitação da opsonização, formação de granuloma, processamento e apresentação de antígeno, expressão MHC II, fusão do fagolisossomo, produção de intermediários reativos ao oxigênio, produção e liberação de óxido nítrico (NO), favorecimento da expressão de iNOS, TNF- α , da quimiocina KC e interleucina-1 β (IL-1 β) são importantes exemplos (revisados por Adams e Templeton, 1998; Blackwell e Searle, 1999).

Nos bovinos, a resistência natural está associada ao polimorfismo da 3'UTR (região não-traduzida da extremidade 3') do gene *Nramp1*. E esse polimorfismo corresponde à variação no número de

repetições de dinucleotídeos GT. Trabalhos demonstraram que o alelo (GT)₁₃ está relacionado à resistência natural à brucelose *in vivo* (Adams e Templeton, 1998) e ao controle da replicação de *B. abortus* no interior de macrófagos (Barthel et al., 2001). Entretanto estudos recentes mostraram que os polimorfismos da região 3'UTR do *Nramp1* não afeta a resistência contra *B. abortus* em bovinos e que estes não funcionam como marcadores de resistência contra brucelose bovina (Paixão et al., 2006).

Existe um segundo membro pertencente à família do *Nramp1*, o *Nramp2* (*Slc11a2*) que codifica uma proteína que possui 78% de homologia com o *Nramp1*. O *Nramp2* funciona como o principal sistema de transporte de ferro independente de transferrina nas células intestinais e também atua age como um sistema de aquisição intracelular de ferro, transportando o ferro e outros cátions divalentes dos endossomos acidificados para o citoplasma de célula (Gruenheid e Gros, 2000).

A resistência natural a patógenos tem sido ligada a diferentes raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e taurinas (*Bos taurus taurus*). Estudos indicam que as raças zebuínas são mais resistentes a babesiose (Parker et al., 1985; Bock et al., 1999), a carrapatos (Rechav e Kostrzewski, 1991; Wambura et al., 1998) e a nematodos (Peña et al., 2000), quando comparadas às raças taurinas. Na África, existe um *Bos taurus*, o Gambian N'Dama, comprovadamente mais resistente à tripanossomíase que as demais raças bovinas (Naessens et al., 2002). Em estudo utilizando diferentes raças de taurinos e zebuínos na resistência natural ao *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e *Babesia bovis*, verificou-se que a raça Nelore é mais resistente, inclusive quando

comparada às demais raças zebuínas (Utech et al., 1978; Madruga et al., 1984).

Em várias espécies animais, como camundongos, coelhos e suínos, a resistência natural contra a infecção por *Brucella* sp é geneticamente determinada (Adams e Templeton, 1995). Por exemplo, em suínos, o cruzamento de animais que não desenvolvem anticorpos após infecção por *B. suis*, portanto considerados resistentes, gera uma progênie 76% resistente a brucelose (Cameron et al., 1942). Entretanto, o mecanismo envolvido na resistência natural assim como os genes envolvidos no controle da resistência ainda não foram esclarecidos (Paixão et al., 2007).

A partir de um estudo de seleção e cruzamento de vacas e touros resistentes e susceptíveis, determinou-se a resistência natural à infecção por *B. abortus* em bovinos. Os animais foram considerados resistentes na ausência da manifestação clínica de aborto e ausência de isolamento de *B. abortus* (Adams e Templeton, 1995; Adams e Templeton, 1998).

Pesquisas demonstraram que a frequência de fenótipos naturalmente resistentes na população bovina em geral é de 20%, sendo que o cruzamento de touros e vacas resistentes proporcionou um aumento de tal frequência para 58,6% e que análises genéticas dos resultados destes acasalamentos foram consistentes com a existência de dois ou mais genes controlando os fenótipos resistentes (Adams e Templeton, 1995). Portanto, pode-se concluir que a resistência natural à *B. abortus* em bovinos é hereditária e que a frequência de genótipos resistentes pode ser aumentada por seleção genética através de acasalamentos dirigidos.

OBJETIVOS

i. Verificar se há diferenças quanto à resistência à *Brucella abortus* entre raças taurinas e zebuínas, através da observação do crescimento ou não de *B. abortus* em macrófagos.

ii. Identificar fatores associados à imunidade inata que participam na resposta do macrófago bovino durante a infecção por *B. abortus*.

iii. Analisar o perfil da transcrição de *Nramp1*, *iNOS*, *TNF- α* , *IL-10*, *IL-12* e *IL-4* durante a infecção por *B. abortus* e comparar a magnitude da indução destes genes entre zebuínos e taurinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados bovinos jovens taurinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) e zebuínos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), machos, de progênie de pais e mães distintos, provenientes de rebanhos comerciais livres de brucelose. Uma vez que os animais utilizados durante o experimento não poderiam ser vacinados contra brucelose, optou-se por utilizar animais machos, tendo em vista que a vacinação de fêmeas é mandatória. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG, protocolo nº 143/2010).

Isolamento de macrófagos bovinos

Foram isolados macrófagos bovinos derivados de monócitos do sangue periférico, segundo protocolo previamente descrito por Campbell e Adams (1992) e

Qureshi et al. (1996). Foi coletado sangue da veia jugular em uma seringa de 60 ml, contendo 8 ml de anticoagulante (ácido-citrato-dextrose) (Figura 1A). O sangue foi diluído em um volume igual de salina de tampão fosfato (PBS) estéril (pH 7,4), contendo 13 mM de citrato de sódio (PBS-citrato) (Figura 2B) e depositado sobre uma coluna de solução de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) com densidade específica de 1,077 (mistura de: 10:1 Percoll, 1,5 M NaCl em 12% NaH₂PO₄, 130 mM trisodium citrato, 5% albumina sérica bovina, e PBS [ajustada para um índice final de refração de 1,3460]) (Figura 2C). Após centrifugação de 1000 x g por 20 min. (Figura 2D), as células da interface mononuclear foram transferidas para um tubo de polipropileno estéril. As células, então, foram lavadas três vezes em PBS-citrato, centrifugando a 400 x g por 10 min. a cada lavagem e, ao final, ressuscendidas em 8 ml de RPMI (Gibco, Invitrogen, CA, USA) suplementado com 4 mM L- glutamina (Gibco), 1mM de aminoácidos não essenciais (Gibco), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 2,9 mM de bicarbonato de sódio a 7,5% (Gibco), acrescido de 4% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco) e 0,1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco) (Figura 2E). As células em suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de teflon de 100 ml (Nalgene Company, NY, USA) e encubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas (Figura 2F). Células não aderentes foram removidas e 8 ml do meio RPMI suplementado contendo 12,5% de SFB sem antibiótico foram adicionados em cada frasco. Os frascos foram incubados em estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 11 dias, trocando o meio a cada três dias.

Infecção por *Brucella abortus* em macrófagos bovinos

Os macrófagos foram colhidos de 14 animais, sendo sete zebuínos e sete taurinos, após 11 dias em cultivo, por resfriamento dos frascos em gelo por 20 a 30 minutos, seguido de forte agitação e transferidos para tubos de polipropileno estéril utilizando pipetas de transferência. Após centrifugação por 10 min. a 1000 x g, os macrófagos foram ressuscendidos em 1 ml de RPMI suplementado, contendo 12,5% de SFB e com o auxílio de câmara de hemocítômetro e exclusão de azul de tripan, determinou-se a concentração de células viáveis. A partir daí foram novamente rediluídos e semeados em placas de 96 poços na concentração de 5 x 10⁴ células por poço e incubados até o dia seguinte a 37°C em 5% de CO₂. Os macrófagos foram inoculados com a amostra 2308 de *B. abortus*, cultivada em placa de agar triptona de soja (TSA) (Difco, BD Biosciences, CA, EUA), à 37°C por 72 horas e, então, suspensa em PBS estéril. A concentração do inóculo foi quantificada por espectrofotometria e diluída para concentração final de 5 x 10⁷ UFC (unidades formadoras de colônia)/ml. Para inoculação, o meio de cada poço foi substituído por 100 µl de suspensão bacteriana, para que a multiplicidade de infecção fosse de 100:1. As placas foram centrifugadas a 1000 x g por 5 min., incubadas por 30 min. a 37°C em 5% de CO₂. Posteriormente, adicionou-se 100 µl de meio RPMI suplementado contendo 12,5% de SFB de concentração final de 50 µg/ml de gentamicina (Gibco) e incubou-se por uma hora a 37° C em 5% CO₂ para inativação das bactérias extracelulares. Os macrófagos foram lavados uma vez com PBS e lisados com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 0,01% ou

incubados em RPMI suplementado contendo 12,5% de SFB e 25 µg/ml de gentamicina. Os lisados foram diluídos em PBS estéril e semeados em placas de TSA para contagem de UFC. Os números obtidos após uma hora de cultivo em gentamicina foram comparados aos números obtidos às 24 e 48 horas pós-inoculação (hpi) para o cálculo do percentual de internalização e sobrevivência intracelular. A concentração do inóculo foi confirmada por plaqueamento em TSA. O inóculo foi também incubado em meio RPMI contendo gentamicina por 1 hora para confirmar a atividade do antibiótico.

Depleção lisossomal de ferro

Para verificar se a sobrevivência intracelular de *B. abortus* é dependente da disponibilidade intralisossomal de ferro, os experimentos descritos acima foram repetidos sob condições de depleção intralisossomal de ferro. Os macrófagos foram tratados com 1 mM de desferrioxamina (DFO) (Sigma-Aldrich), que é um quelador de ferro lisossomotrópico (Persson et al., 2003), por uma hora antes da inoculação com *B. abortus*. Macrófagos e *B. abortus* foram cultivados separadamente em meio contendo DFO para assegurar que o composto não é tóxico.

Mutante do operon *dhbCEBA* de *Brucella abortus*

Para complementar a caracterização da interação entre expressão de *Nramp1* e aquisição de ferro por *B. abortus* no ambiente do fagolisossomo, a cepa 2308 de *B. abortus* foi submetida à mutação polar do gene *dhbC* para inativação do operon *dhbCEBA*, responsável pela biossíntese do sideróforo 2,3-ácido dihidroxibenzoico

(2,3-DHBA) em resposta à limitação de ferro (Bellaire et al., 2003a) e o mutante gerado foi incluído nos experimentos já descritos anteriormente para cepa parental. Resumidamente, a região codificadora do operon *dhbCEBA* foi inicialmente amplificada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o produto obtido inserido no vetor pCR2.1TOPO-TA, utilizando kit de clonagem TOPO (Invitrogen). O inserto foi retirado do TOPO-TA com dupla digestão, utilizando as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, e clonado no vetor pBluescript KS. Um fragmento de 381 pb interno da região codificadora do *dhbC* foi substituída por um gene de resistência à canamicina KIXX (1,6 kb) a partir da digestão de pUC4-KIXX (Amersham Pharmacia Biotech., EUA) com a enzima *Sma*I, seguida da digestão do vetor pBluescript com enzima *Eco*RV. O plasmídeo modificado, então, foi introduzido dentro da *B. abortus* 2308 por eletroporação, segundo protocolo previamente estabelecido por Tatum et al. (1992).

Inicialmente, a cepa 2308 *B. abortus* foi crescida em meio TSA por 72 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. As placas foram raspadas, a amostra foi suspensa em 40 ml meio líquido TSB (*Trypticase Soy Broth*) e dividida em dois tubos falcons de 50 ml, que foram mantidos no gelo. Após centrifugação a 4.000 x g por 20 min. a 37°C, o sobrenadante foi descartado e cada “pellet” de bactéria foi ressuspenso e lavado três vezes em 20 ml de água estéril gelada, utilizando pipetas de 25 ml geladas. No final, a suspensão de bactéria foi transferida para um único tubo e ressuspenso em 1 ml de água estéril, mantida no gelo até o momento da eletroporação.

Para a eletroporação, foram adicionados 10 µl do plasmídeo em 50 µl de suspensão de *B. abortus* eletrocompetente, transferidos para uma cubeta estéril de 0,1 cm (BioRad Laboratories, CA, EUA) e submetida a um choque de 2,2 KV e 5,4 ms, utilizando o equipamento eletroporador da BioRad (BioRad Laboratories, CA, EUA). Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio SOCB (2% tryptona, 0,5% extrato levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose) e incubado a 37°C por 16 horas sob agitação. Em seguida, 100 µl e 900 µl de cada amostra foi plaqueada em meio TSA com canamicina a 100 µg/ml (Gibco) e incubada por 4 a 7 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As colônias crescidas foram replaqueadas em linha em meio TSA com canamicina e em meio TSA com ampicilina a 200 µg/ml (Gibco) e incubadas novamente por 4 a 7 dias e, finalmente, colônias mutantes que eram resistentes à canamicina e sensíveis à ampicilina foram selecionadas, que foram confirmadas por PCR.

Extração de RNA total

Para análise da transcrição de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos bovinos durante a infecção por *B. abortus*, foram semeados macrófagos de 10 taurinos e 10 zebuínos em placas de seis poços na concentração de 1x10⁶ células por poço sob as mesmas condições descritas anteriormente e inoculados com a amostra 2308 de *B. abortus* com uma multiplicidade de infecção de 100:1. O RNA total foi extraído às 12 e 24 horas após a inoculação, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primeiramente, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 1 ml de Trizol no poço, homogeneizando-o bem por pipetagem e, em seguida,

transferiu-se o conteúdo para microtubos livres de RNase. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de clorofórmio ao microtubo, homogeneizados em vórtex, seguido de centrifugação a 12.000 x g, durante 15 minutos, a 4°C. A fase superior das amostras centrifugadas foram transferidas para novos microtubos livres de RNase e, em seguida, adicionou-se 500 µl de isopropanol, para a precipitação do RNA, e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, durante 15 minutos, a 4°C. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de etanol a 70% e centrifugados a 7500 x g por 5 min.. Por fim, os *pellets* obtidos foram secos à temperatura ambiente, ressuspensos em 30 µl de água livre de RNase e estocados em freezer a -80°C até a síntese do cDNA. A pureza e a quantidade de RNA foram determinados por espectrofotometria e a qualidade por eletroforese em gel de agarose/formaldeído a 1%.

Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA, utilizou-se o kit comercial *SuperScript First-Strand Synthesis System* para RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), em uma reação de volume final de 20 µL. Para a síntese foram utilizados 1µg de RNA total, 1 µL de dNTP mix, 1 µL de hexâmeros aleatórios, 2 µL de tampão RT (10x), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT (dithiothreitol) a 0,1 M, 1 µL de *RNase OUTTM Recombinante Ribonuclease Inhibitor*, 1 µL de *Super ScriptTM II RT* e 1 µL de RNase H. Os parâmetros utilizados foram 65° C por 5 min., 25° C por 2 min., 25° C por 10 min., 42° C por 50 min., 70° C por 15 min. e 37° C por 20 min. Ao final, o cDNA foi estocado em freezer a -20°C até o

momento da realização da realização da técnica.

RT-PCR quantitativo em tempo real

Para realizar a RT-qPCR em tempo real, utilizou-se 2,5 µl de cDNA, 1 µL de *primer forward* e 1 µL *primer reverse* para cada gene, ambos a uma concentração de 10 µM e 12,5 µl de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – UDG with ROX, Invitrogen)* em um volume final de 25 µl por reação. Os parâmetros utilizados foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando um termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems). Foi utilizado o método comparativo de Ct (*cycle threshold*) para análise dos dados, como descrito por (Livak e Schmittgen, 2001). Alterações relativas na expressão gênica foram calculadas em relação à expressão gênica dos respectivos genes nas células controle não infectadas. As quantidades de mRNA de *Nramp1*, *iNOS*, *TNF-α*, *IL-10*, *IL-12* e

IL-4 foram comparadas entre macrófagos infectados e controles e a magnitude da indução destes genes foi comparada entre zebuínos e taurinos. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1. As quantidades de mRNA foram normalizadas com base na expressão de *GAPDH*.

Mensuração da produção de Óxido Nítrico

A produção de NO foi avaliada em macrófagos bovinos de ambas as espécies após o desafio com *B. abortus*, baseado no acúmulo do produto final estável de NO, NO₂, no sobrenadante, utilizando o reagente de Griess (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, macrófagos de 12 bovinos, sendo 6 taurinos e 6 zebuínos, foram semeados em placas de 96 poços e infectados sob as mesmas condições já descritas anteriormente e o sobrenadante coletado às 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação.

Tabela 1 – Lista de genes e *primers* para RT-qPCR em tempo real.

Gene	Primers	Número de acesso no GenBank
<i>Nramp1</i>	F: 5' - AAGATCCCCATTCCGGATAC - 3' R: 5' - AGCCTGAAGATCCGACTCAA - 3'	NM_174652.2
<i>iNOS</i>	F: 5' - AGCGGAGTGACTTTCCAAGA - 3' R: 5' - TTTTGGGGTTCATGATGGAT - 3'	NM_001076799.1
<i>TNFα</i>	F: 5' - AACATCCTGTCTGCCATCAAG - 3' R: 5' - GGAAGACTCCTCCCTGGTAGAT - 3'	EU276079.1
<i>IL-12</i>	F: 5' - CAAAAAGGAAGATGGAATTTGG - 3' R: 5' - CCAGAATAATCCTTTGCCTCAC - 3'	EU276076.1
<i>IL-10</i>	F: 5' - CCAAGCCTTGTCGGAAATGA - 3' R: 5' - GTTCACGTGCTCCTTGATGTCA - 3'	EU276074.1
<i>IL-4</i>	F: 5' - TTGGAATTGAGCTTAGGCGTAT - 3' R: 5' - CCAAGAGGTCTTTCAGCGTACT - 3'	EU276069.1
<i>GAPDH</i>	F: 5' - ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACG - 3' R: 5' - TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGGTC - 3'	NM_001034034.1

As amostras foram armazenadas em freezer à - 80°C até o momento da realização do ensaio.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Macrófagos de Nelore (n=1) e Holandês (n=1) foram semeados em placas de 24 poços na mesmas condições já descritas anteriormente. Após 48 horas, o sobrenadante foi substituído por uma solução de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0.1M (pH 7,2) e incubadas a temperatura ambiente por 24 horas. Células foram então removidas e centrifugadas a 1000 x g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em tampão cacodilato 0.1M (pH 7,2) e processado para TEM. Resumidamente, células foram lavadas em tampão cacodilato 0.1M (pH 7,2) e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8% por 1h a temperatura ambiente. Células foram lavadas com tampão cacodilato 0.1M (pH 7,2) e desidratadas em solução de concentração decrescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100% duas vezes). As células foram vagarosamente impregnadas em resina Epon diluída 1:1 com acetona 100% por 12 horas e, então, embebidas em resina Epon 100% por 6 horas e polimerizadas a 60°C por 48 horas. Secções ultrafinas foram feitas em ultramicrotômo (Leica EM UC6, Áustria), contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo. As grids produzidas foram lidas em microscópio de transmissão (Tecnai G2-12-12 kV - FEI SpiritBiotwin, EUA).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento utilizado para o experimento foi o inteiramente casualizado. Os números de UFC e os valores de Ct normalizados sofreram transformação

logarítmica, antes da análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de t Student (GraphPad InStat3, USA) e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

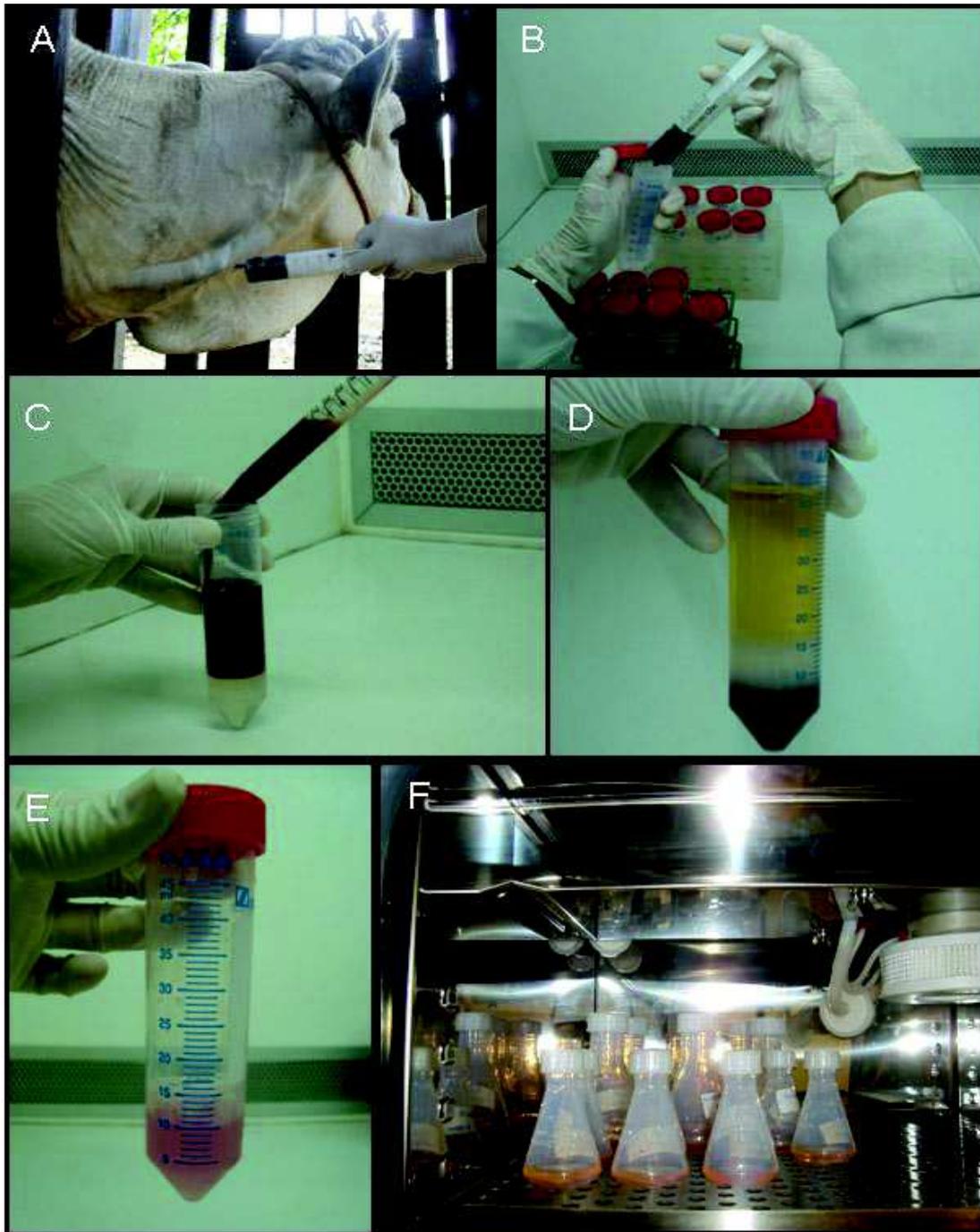


Figura 1 – Coleta de sangue bovino da veia jugular (A), diluição em PBS-citrato (B), deposição em coluna de Percoll (C), centrifugação (D), ressuspensão em meio RPMI (E) e incubação em estufa a 37° C em 5% CO₂ (F).

RESULTADOS

Invasão e sobrevivência da cepa parental e mutante $\Delta dhbCEBA$ de *Brucella abortus* em macrófagos bovinos, em condições normais ou sob quelação de ferro intralisossomal

Em bovinos, o fenótipo resistente à brucelose está relacionado à capacidade dos macrófagos de controlarem a replicação *in vitro* de *B. abortus* (Harmon et al., 1989; Price et al., 1990; Campbell e Adams 1992; Qureshi et al., 1996). Sendo assim, macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de taurinos e zebuínos foram desafiados com a cepa 2308 de *B. abortus* ou com a cepa mutante $\Delta dhbCEBA$ de *B. abortus* com ou sem quelação de ferro intralisossomal e os dados obtidos de UFC foram comparados entre as duas espécies nos tempos 0, 24 e 48 horas pós-infecção como mostra a Figura 2. O número de UFC *B. abortus* foi similar em 0 hpi e decresceu igualmente até 24 hpi tanto em macrófago de Holandês quanto de Nelore. No entanto, no tempo 48 hpi, houve um aumento significativo do número de UFC de *B. abortus* em macrófagos de Holandeses, quando ao comparado ao macrófago do Nelore ($p < 0,0001$). A cepa mutante $\Delta dhbCEBA$ mostrou-se significativamente mais atenuada em macrófagos de Nelore e Holandês quando comparada à cepa parental de *B. abortus* ($p < 0,0001$) nos tempos 24 e 48 hpi. Interessantemente, macrófagos de nelore foram mais eficazes em controlar a replicação no tempo 24 hpi ($p < 0,01$) e 48 hpi ($p < 0,0001$) (Figura 2A). Adicionalmente, quando houve quelação de ferro intralisossomal, *B. abortus* decresceu em macrófagos de ambas as espécies em 48 hpi ($p < 0,001$), embora macrófagos de Nelore serem mais eficazes em controlar a replicação ($p < 0,001$) no tempo 48 hpi

(Figura 2B). A cepa $\Delta dhbCEBA$ também decresceu sob condições de quelação de ferro em 24 e 48 hpi ($p < 0,01$) em macrófagos de Nelore (Figure 2C). Não foram observadas diferenças significativas na invasão quando comparados macrófagos de ambas as espécies. Estes resultados indicam que macrófagos de bovinos da raça Nelore são efetivos no controle da replicação de *B. abortus in vitro* quando comparados aos macrófagos bovinos da raça Holandesa, sugerindo, inicialmente, que animais zebuínos podem ter algum grau de resistência natural à brucelose. Análise ultraestrutural de macrófagos bovinos infectados revelou que *B. abortus* foi localizado dentro de vacúolos citoplasmáticos (Fig. 3A) e, em 48 hpi, a maioria dos vacúolos tinham uma membrana visivelmente eletrodensa com projeções digitiformes derivadas da membrana vacuolar (Fig. 3B). Além disso, nenhuma diferença ultraestrutural foi observada quando macrófagos de Nelore e Holandês foram comparados.

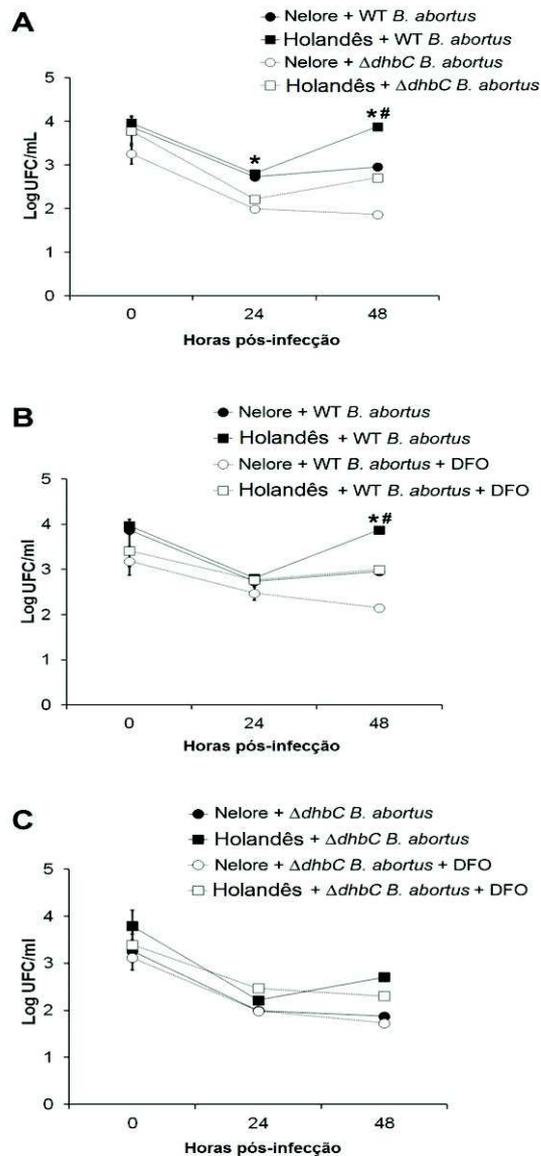


Figura 2 – Invasão e sobrevivência intracelular da cepa parental de *B. abortus* e da cepa mutante Δdhb CEBA de *B. abortus* em macrófagos bovinos derivados de monócitos do sangue periférico com ou sem quelação de ferro intralisossomal: macrófagos de Nelore e Holandês foram desafiados com a cepa parental 2308 de *B. abortus* e mutante Δdhb CEBA em condições normais (A) e comparados sob quelação de ferro (B e C). Os dados representam média e erro padrão (n=7). * indica diferença estatística significativa entre as cepas parental e mutante com ou sem quelação de ferro em macrófagos da mesma raça. # indica diferença estatística significativa entre a cepa parental ou mutante com ou sem quelação de ferro intralisossomal em macrófagos de Nelore e Holandês.

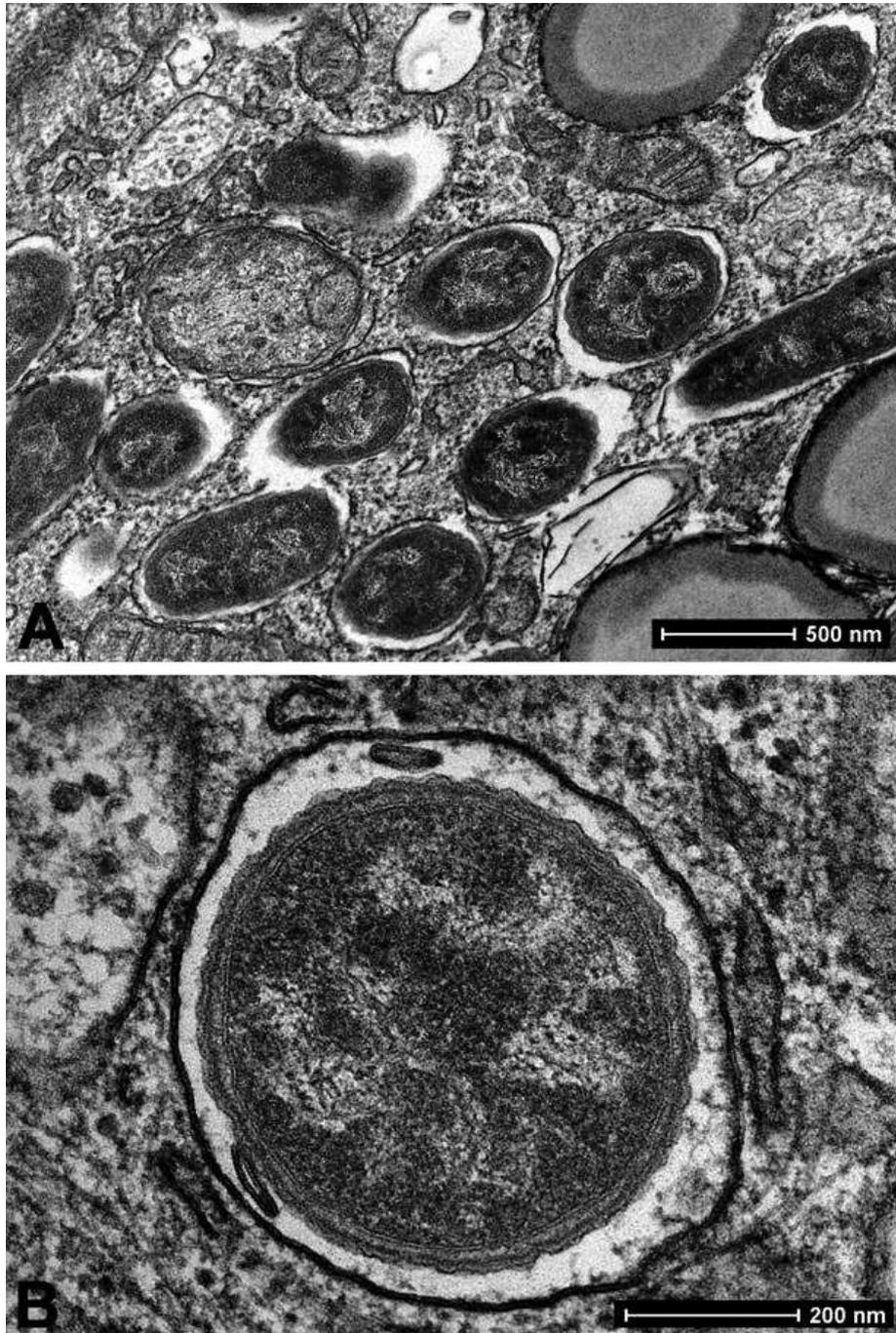


Figura 3 – Micrografias eletrônicas de transmissão de macrófagos derivados de monócitos infectados com *B. abortus* de Holandês (A) e Nelore (B) 48 horas após a infecção.

Expressão gênica de *Nramp1*, *TNF- α* , *iNOS*, *IL-10*, *IL-12* e *IL-4* durante a infecção por *Brucella abortus* em macrófagos bovinos

Para caracterizar a expressão de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por *B. abortus* em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico, RNA total foi extraído as 12 e 24 hpi e RT-qPCR em tempo real foi realizado para avaliação dos genes que codificam *Nramp1*, *TNF- α* , *iNOS*, *IL-10*, *IL-12* e *IL-4* e os dados obtidos foram comparados aos macrófagos controles não infectados ou entre macrófagos de Holandês e Nelore, como demonstrado nas Figura 4.

A análise dos resultados demonstrou maior expressão de *iNOS* em macrófagos de nelore do que macrófagos de Holandês 12 hpi com *B. abortus* ($p < 0,0001$), em relação aos seus respectivos controles não infectados (Figura 4A). A expressão de *TNF- α* foi suprimida em macrófagos de Holandês com 12 hpi em relação com seu controle negativo, diferindo da resposta observada em macrófagos de Nelore, que apresentaram indução da transcrição em resposta à infecção, sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,001$) quando compara-se os dados de ambas as espécies (Figura 4A). Interessantemente, macrófagos de Holandês expressaram níveis de transcrição de *IL-4* mais elevados do que macrófagos de Nelore ($p < 0,001$) em 12 hpi, em relação aos seus controles não infectados (Figura 4A). Não houve diferença estatística significativa na transcrição de *Nramp1* ao logo da infecção.

Resultado semelhante também foi observado com relação a *IL-10* e *IL-12* em 12 hpi. No entanto, quando se analisa os dados obtidos às 24 hpi, observa-se aumento na transcrição de *IL-10* em macrófagos de Holandês, diferindo do macrófago de Nelore, nos quais ocorreu diminuição, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) (Figura 4B). Já os dados obtidos para *IL-12* mostrou um perfil inverso, com macrófagos de Nelore apresentando maior transcrição em relação ao seu controle negativo, enquanto macrófagos de Holandês tiveram diminuição na transcrição. A comparação destes dados entre as duas espécies mostraram diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) (Figura 4B). Com base nesses achados, pode-se observar claramente que macrófagos de bovinos Nelores apresentam maior transcrição de citocinas envolvidas no controle intracelular de patógenos, incluindo *B. abortus*, além de apresentarem um perfil de resposta Th1.

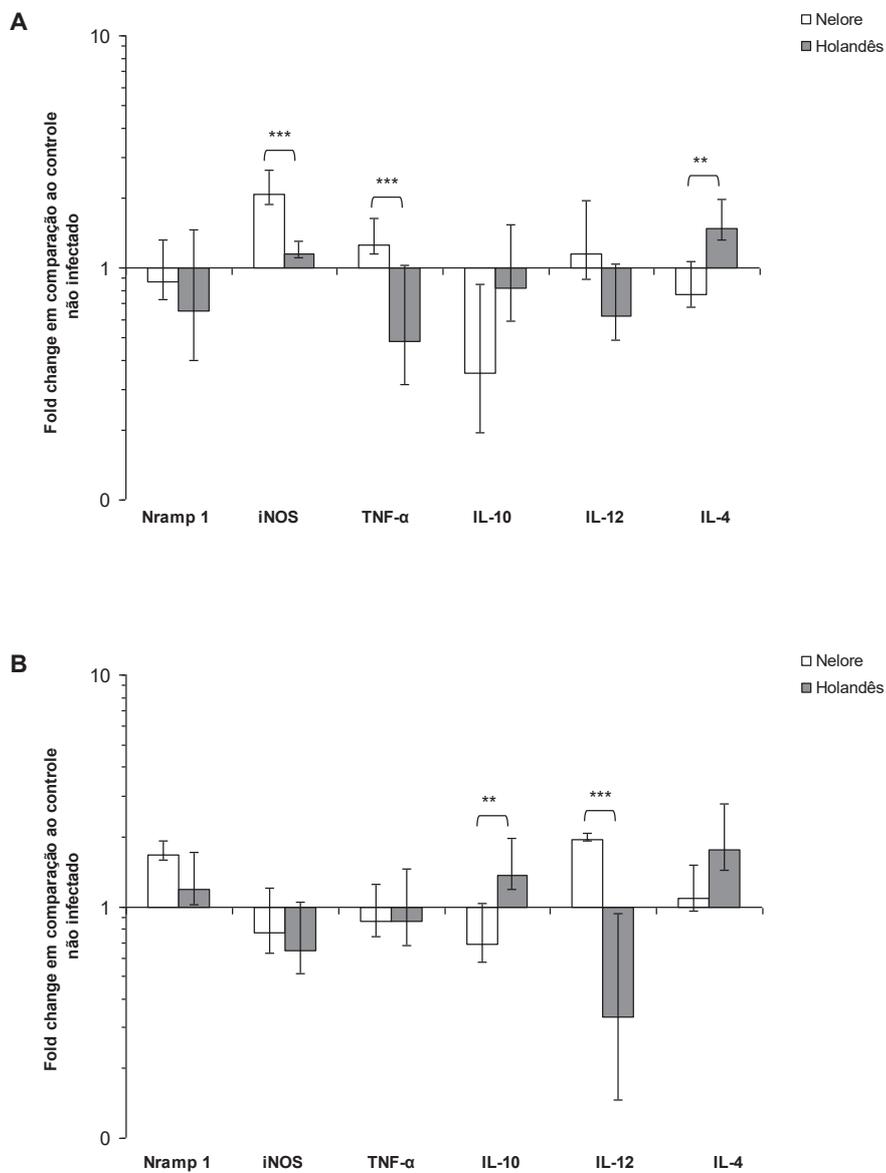


Figura 4 – Expressão de *Nramp1*, *iNOS*, *TNF-α*, *IL-10*, *IL-12* e *IL-4* em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de Nelore (n=10) e Holandês (n=10) em 12 (A) e 24 horas pós-infecção (B) em comparação aos controles não infectados. Colunas representam médias e erro padrão. Todos os dados sofreram transformação logarítmica antes da análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t de Student. Diferença significativa entre os dados de Nelore e Holandês está indicada por asteriscos (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

Produção de NO em macrófagos derivados de monócitos de bovinos Nelore e Holandês após infecção por *Brucella abortus*

Para melhor avaliar se a maior eficiência em controlar a replicação de *B. abortus* observada em macrófagos de Nelore estava associada a mediadores pró-inflamatórios, foi mensurada a produção de NO em macrófagos de bovinos Nelore e Holandês após o desafio com *B. abortus*, nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 hpi. Houve maior produção de NO por macrófagos de Nelore nos tempos 6, 12 e 24 hpi ($p < 0,001$; $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), quando comparados aos macrófagos de Holandês (Figura 5). Surpreendentemente, observa-se que há uma maior produção de NO em macrófagos não infectados (controle negativo) comparados aos macrófagos infectados com *B. abortus* de ambas as espécies no tempo 48 hpi ($P < 0,001$), sugerindo um efeito inibitório da produção de NO nos tempos tardios de infecção (Figura 5). Além disso, a análise dos resultados também revelou que *B. abortus* induziu menos NO em macrófagos bovinos, quando comparados aos controles positivos, em ambos os macrófagos. Ao se comparar os níveis de produção de NO com os dados obtidos de CFU, percebe-se que a maior acumulação de nitrito no sobrenadante se dá anteriormente ao tempo em que se observa diferença de controle de replicação de *B. abortus* (48 hpi) nos macrófagos bovinos. Juntos, esses resultados sugerem que o fenótipo observado em macrófagos de nelore em controlar mais eficientemente a replicação de *B. abortus* pode estar relacionado a uma maior produção de NO nos tempos iniciais da infecção.

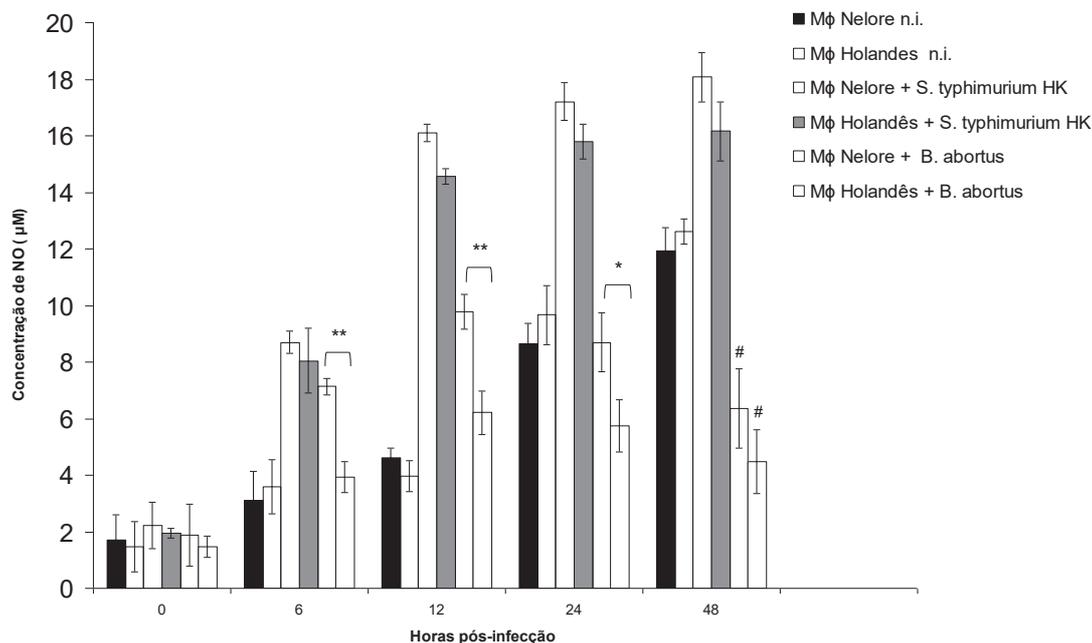


Figura 5 – Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos bovinos infectados com *B. abortus*. A concentração de NO foi determinada no sobrenadante da cultura de macrófagos de Nelore (n=6) e Holandês (n=6) não infectados (n.i.), como controle negativo, ou desafiados com *B. abortus*, utilizando o reagente de Griess (μM). *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium inativada pelo calor foi usada como controle positivo. Colunas representam médias e desvio padrão. Diferença significativa entre os dados de Nelore e Holandês está indicada por asteriscos (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$). # indica diferença significativa entre o controle não infectado.

DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se que macrófagos derivados do sangue periférico de bovinos da raça Nelore possuem a habilidade de controlar a replicação de *B. abortus* mais eficientemente quando comparados a macrófagos da raça Holandesa. A habilidade de macrófagos bovinos em controlar a replicação de *B. abortus* já foi demonstrada como um importante fator na resistência natural à brucelose (Harmon et al., 1989; Price et al., 1990; Campbell e Adams, 1992; Campbell et al., 1994; Qureshi et al., 1996; Rossetti et al., 2011). No entanto, esses estudos foram conduzidos com animais selecionados geneticamente através de acasalamentos

dirigidos para a resistência contra a brucelose.

Já é bem caracterizado que *B. abortus* adere e é fagocitada por fagócitos profissionais, como o macrófago, e não profissionais, como o trofoblasto, estabelecendo replicação e infecção persistente no interior destas células hospedeiras (Campbell et al., 1994; Pizarro-Cerdá et al., 2000; Carvalho-Neta et al., 2008; Carvalho-Neta et al., 2010). Dessa forma, estudos da ação bactericida de macrófagos podem ser utilizados para identificar fenótipos resistentes de brucelose em bovinos (Qureshi et al., 1996). Os resultados iniciais demonstraram que *B. abortus* adere e internaliza de maneira semelhante nos macrófagos de ambas as raças bovinas. No

entanto, Campbell e Adams (1992), Campbell et al. (1994) e Rossetti et al. (2011) mostraram que macrófagos de bovinos fenotipicamente resistentes são menos permissivos a invasão por *B. abortus* do que macrófagos de bovinos susceptíveis, inclusive com redução do número de bactérias em 12 hpi. Como o tempo 12 hpi não foi avaliado durante este trabalho, não se pode afirmar se há diferenças quanto ao número de UFC nesse tempo. No entanto, o número de UFC obtidos em 24 hpi foi semelhante em macrófagos de ambas as espécies. Em 48 hpi, observou-se que o houve um decréscimo do número de *B. abortus* em macrófagos de bovinos Nelore, enquanto que em macrófagos de bovinos Holandeses o número de bactérias aumentou, resultado semelhante ao observado por Campbell et al. (1994).

O ferro é o íon metálico mais abundante em sistemas biológicos, envolvidos em vários processos metabólicos e essencial para a maioria dos organismos vivos. Assim, o ferro torna-se necessário tanto para a célula hospedeira quanto para o agente infeccioso. No hospedeiro, formas livres de ferro são mantidas a níveis muito baixos, sendo a maior parte presente na forma de hemoglobina ou ligada a proteínas captadoras de ferro, como transferrina, lactoferrina e ferritina (Payne, 1993). Dessa forma, postulou-se que sistemas de aquisição de ferro seja um pré-requisito para a patogenicidade bacteriana (Ratledge e Dover, 2000). Em condições limitantes de ferro, muitas bactérias Gram-negativas liberam agentes quelantes de ferro, de baixo peso molecular e de alta afinidade, denominados sideróforos (Neilands, 1992). Em resposta a limitação de ferro, *B. abortus* secreta um sideróforo, o ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA), codificado pelo operon *dhbCEBA*, permitindo a

captação de ferro a partir de proteínas da célula hospedeira (Lopez-Goñi et al., 1992; Parent et al., 2002; Bellaire et al., 2003a). Os resultados demonstraram que o mutante $\Delta dhbCEBA$ de *B. abortus* foi mais atenuado quando comparado à cepa parental, sendo esse fenótipo ainda mais exacerbado sob depleção intralisossomal de ferro, embora Bellaire et al., 1999 tenham demonstrado que *Brucella* não necessita do sideróforo 2,3-DHBA para sua virulência em macrófagos murinos, nem para o estabelecimento da infecção em camundongos BALB/c. No entanto, outros trabalhos tem mostrado que a síntese desse sideróforo é essencial para a manutenção da virulência de *B. abortus* em ruminantes (Bellaire et al., 2003a; Bellaire et al., 2003b).

Estudos têm demonstrado que a limitação de ferro é mais notável para patógenos intracelulares, como *Brucella* e *Mycobacterium*, devido, principalmente, a habilidade de macrófagos em reduzir ainda mais a concentração de ferro intracitoplasmática através de síntese de proteínas, como a proteína do macrófago associada à resistência natural, Nramp1 (Gruenheid et al., 1995). O Nramp1 bovino foi identificado e sequenciado inicialmente por Feng et al. em 1996 e apesar de a expressão da proteína Nramp1 está associada com várias características fagocitárias que favorecem a eliminação de patógenos intracelulares (revisados por Adams e Templeton, 1998; Blackwell e Searle, 1999), o papel do Nramp1 na infecção por *B. abortus* permanece ainda controverso (revisado por Adams e Schutta, 2010). Polimorfismos da região não traduzida da extremidade 3' (3'UTR) do *Nramp1* tem sido extensivamente estudados em diferentes espécies como o búfalo (Martinez et al., 2005; Borriello et al.,

2006; Capparelli et al., 2007a; Capparelli et al., 2007b; Ganguly et al., 2008), bovino (Kumar et al., 2005; Paixao et al., 2007) e o homem (Bravo et al., 2006), no entanto, dados gerados com esses trabalhos são contrastantes. Como mostra a Figura 3A e 3B, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de mRNA de *Nramp1* entre macrófagos de Nelore e Holandês. Adams e Templeton (1998) correlacionaram a frequência de fenótipos resistentes com a atuação do gene *Nramp1*, como possível gene controlando tal característica. No entanto, Paixão et al. (2007), em estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram a ausência de associação entre polimorfismos da região 3'UTR do gene *Nramp1*, previamente apontados como associados a resistência natural (Adams e Templeton, 1998; Barthel et al., 2001), e a resistência natural à brucelose bovina. Da mesma forma, estudos realizados em camundongos susceptíveis e resistentes à brucelose, apontaram que o gene *Nramp1* não é o maior determinante no controle de *B. melitensis* nesta espécie (Guilloteau et al., 2003).

O hospedeiro necessita de mecanismos da resposta imune para proteger-se de patógenos invasores. Nesse universo, a imunidade inata atua não somente como uma primeira linha de defesa, mas também induz e modula a resposta imune adquirida (revisado por Adams e Schutta, 2010). Interessantemente, os níveis de expressão da *IL-12* e *TNF- α* foram maiores em macrófagos de bovinos nelores em comparação aos macrófagos holandeses, enquanto que estes expressaram maiores níveis de *IL-4* e *IL-10*. *IL-12* e *TNF- α* são duas citocinas, produzidas, principalmente, por macrófagos, que desempenham importante papel na resistência à infecção por patógenos intracelulares (Zhan et al.,

1996). A ativação de linfócitos T CD4⁺ ocorre a partir da estimulação por *IL-12*, secretada por macrófagos infectados com *B. abortus in vitro* e *in vivo* (Jones e Winter, 1992; Jiang e Baldwin, 1993). A *IL12* induz a diferenciação dos linfócitos T auxiliares em linfócitos T CD4⁺ subtipo 1 (Th1). O *INF- γ* é a principal citocina sintetizada pela população de linfócitos Th1, amplamente descrita como principal fator ativador das funções bactericidas do macrófago (Jiang e Baldwin, 1993; Splitter et al., 1996; Oliveira et al., 2002). Além disso, *IL-12* está envolvida na resposta imune adaptativa por estímulo direto da atividade citotóxica em linfócitos T CD8⁺ (Zhan et al., 1996). De modo contrário, citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th2, como a *IL-4* e *IL-10*, também têm atuação durante a infecção por *B. abortus*, no entanto atuam de maneira prejudicial no controle da infecção por *B. abortus*, limitando a resposta inflamatória (Fernandes e Baldwin, 1995) e estabelecendo em camundongos infecção persistente (Golding et al., 2001). Além disso, estudos demonstraram que *IL-10* afeta a produção de citocinas Th1, assim como *INF- γ* , por atuarem inibindo mecanismos efetores do macrófago, como a apresentação de antígenos (Fiorentino et al., 1991; Fernandes e Baldwin, 1995) e a produção de NO (Gazzinelli et al., 1992).

A produção de NO, catalisada pela enzima iNOS, constituem um dos principais mecanismos bactericidas do macrófago (MacMicking et al., 1997), com atividade anti-*Brucella* (Wang et al., 2001). No entanto, tanto LPS de *B. abortus* quanto bactéria viva induz fracamente a produção de NO (López-Urrutia et al., 2000; Wang et al., 2001), correlacionando-se com os resultados obtidos neste trabalho. A maior produção de NO pelos macrófagos bovinos da raça nelore correlacionou-se com a

maior expressão do gene *iNOS* em relação ao macrófago do holandês. A associação do fenótipo de aumento da produção de NO com maior expressão de *iNOS*, já foi descrita para outras espécies de *Brucella*, como *B. suis* (Gross et al., 1999; Bagüés et al., 2004) e *B. melitensis* (Bagüés et al., 2004) em macrófagos murinos da linhagem J774.A1. A maior expressão de *iNOS* também já foi observada em outros patógenos intracelulares, como *M. bovis*, em macrófagos bovinos, e a expressão particularmente alta desse gene em granulomas sugere que essa molécula pode estar envolvida na defesa do hospedeiro contra tuberculose em bovinos (Pereira-Suarez et al., 2006). Os dados representados na Figura 4 demonstraram uma baixa produção de NO em macrófagos bovinos desafiados com *B. abortus* em relação ao controle positivo e um claro efeito inibitório da produção de NO pela *Brucella* em tempos mais tardios de infecção, sugerindo que outros mecanismos bactericidas do macrófago podem estar aliados no controle da infecção, como espécies reativas de oxigênio da explosão oxidativa (Jiang et al., 1993; Ko et al., 2002).

CONCLUSÃO

Com base nesses dados, macrófagos de bovinos da raça Nelore controlam melhor a replicação de *B. abortus in vitro*, apresentam maior transcrição de citocinas envolvidas no controle de patógenos intracelulares, além de produzirem mais NO quando comparados aos macrófagos de Holandeses. Estes resultados indicam que macrófagos bovinos de Nelore são mais eficazes em controlar a replicação *in vitro* de *B. abortus*, sugerindo que o gado zebu pode apresentar algum grau de resistência à brucelose.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunol. Cel. e Mol.* 4ed. Local: Revinter, 2003. 544p.
- ADAMS, G. L.; SCHUTTA, J. C. Natural Resistance Against Brucellosis: A Review. *Open. Vet. Sci. J.*, v. 4, p. 61-71, 2010.
- ADAMS, L. G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 553-561, 2002.
- ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J. W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.17, p. 200-219, 1998.
- ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J. W. Identifying candidate genes for natural resistance to brucellosis. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.*, Nevada, p.111-116, 1995.
- BAGÜES, M. P. J.; GROSS, A. T.; DORNAND, J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 2429-2433, 2004.
- BARQUEIRO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D. S.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHACON-DIAZ, C.; RUCAVADO, A.; MORIYON, I.; MORENO, E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE*, v. 7, p. 631, 2007.
- BARTHEL, R.; FENG, J.; PIEDRAHITA, J.A.; McMURRAY, D. N.; TEMPLETON, J. A.; ADAMS, L. G. Stable transfection of bovine Nramp1 gene into murine

- RAW264.7 cells: Effect on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun.*, v. 69, p.3110-19, 2001.
- BELLAIRE, B. H.; ELZER, P. H.; BALDWIN, C. L.; ROOP, R. M. Production of the siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid is required for wild-type growth of *Brucella abortus* in the presence of erythritol under low-iron conditions *in vitro*. *Infect. Immun.*, v. 71, n 5, p. 2927–2932, 2003a.
- BELLAIRE, B. H.; ELZER, P. H.; HAGIUS, S.; WALKER, J.; BALDWIN, C. L.; ROOP II, R. M. Genetic organization and iron-responsive regulation of the *Brucella abortus* 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis *operon*, a cluster of genes required for wild-type virulence in pregnant cattle. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 1794–1803, 2003b.
- BELLAIRE, B. H.; ELZER, P. H.; BALDWIN, C. L.; ROOP II, R. M. The siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid is not required for virulence of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* v. 67, p. 2615–2618, 1999.
- BLACKWELL, J. M.; SEARLE, S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of *Nramp1* (=Ity/Lsh/Bcg). *Immunol. Lett.*, v.65, n.1-2, 73-80, 1999.
- BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.*, v.77, n.7, p.461-464, 1999.
- BORRIELLO, G.; CAPPARELLI, R.; BIANCO, M. Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.* v. 74, p. 2115-2120, 2006.
- BRADLEY, D. J.; TAYLOR, B. A.; BLACKWELL, J.; EVANS, E. P.; FREEMAN, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 37, p.7-14, 1979.
- BRAVO, M. J.; COLMENERO, J. D. E.; MARTIN, D. J. Variation in the *Nramp1* gene does not affect susceptibility or protection in human brucellosis. *Microbes Infect.*, v. 8, p. 154-156, 2006.
- BUNDLE, D. R.; CHERWONOGRODZKY, J.; CAROFF, M.; PERRY, M. B. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v. 138, p. 92-98, 1987.
- CAMERON, H. S.; HUGHES, E. H.; GREGORY, P. W. Genetic resistance to brucellosis in swine. *J. Anim. Sci.*, v.1, p.106-110, 1942.
- CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 34, p. 291-305, 1992.
- CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G.; SOWA, B. A. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v 41, p. 295-306, 1994.
- CAPPARELLI, R.; ALFANO, F.; AMOROSO, M. G. Protective effect of the *Nramp1* BB genotype against *Brucella*

- abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.*, v.75, p. 988-996, 2007a.
- CAPPARELLI, R.; BORRIELLO, G.; MARABELLI, R. The *Nramp1* AA genotype confers susceptibility to *Brucella abortus* in water buffalo. *Mamm. Genome*, v. 18, p. 137-143, 2007b.
- CARVALHO - NETA, A. V.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, v. 184, p. 146-155, 2010. doi:10.1016/j.tvjl.2009.04.010
- CARVALHO NETA, A. V.; STEYNEN, A. P. R.; PAIXÃO, T. A.; MIRANDA, K. L.; SILVA, F. L.; ROUX, C. M.; TSOLIS, R. M.; EVERTS, R. E.; LEWIN, H. A.; ADAMS, L. G.; CARVALHO, O. A. F.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 76, p. 1897-1907, 2008.
- CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D. M.; PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med.*, v. 198, p. 545-556, 2003.
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 3, p. 213-21, 2006.
- CORBEL, M. J. Recent advances in brucellosis. *J. Med. Microbiol.*, v.2, p. 101-103, 1997.
- FERNANDES, D. M.; BALDWIN, C. L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 1130-1133; 1995.
- EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull*, v. 62, p. 743-745, 1992.
- EWALT, D. R.; PAYEUR, J. B.; RHYAN, J. C.; GEER, P. L. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological and histological study. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p. 417-420, 1997.
- FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; SCHURR, E.; GROS, P.; ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J.W. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Research.*, v. 6, p. 956-964, 1996.
- FIorentino, D. F. A.; ZLOTNIK, P.; VIERA, T. R.; MOSMANN, M.; HOWARD, K.; MOORE, W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* v. 146, p. 3444-3451, 1991.
- FORBES, J.R.; GROS, P. Iron, manganese, and cobalt transport by *Nramp1* (*Slc11a1*) and *Nramp2* (*Slc11a2*) expressed at the plasma membrane. *Blood.*, v. 102, n. 5, p.1884-92, 2003.
- FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. Nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Intern. J. of Syst. and Evol. Microb.*, v. 57, 2688-2693, 2007.
- GANGULY, I.; SHARMA, A.; SINGH, R. Association of microsatellite (GT)_n polymorphism at 3'UTR of *Nramp1* with the macrophage function following challenge with *Brucella* LPS in buffalo

- (*Bubalus bubalis*). *Vet Microbiol.*, v. 129, p. 188-96, 2008.
- GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; JAMES, S. L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide dependent production by IFN-g-activated macrophages. *J. Immunol.*, v. 148, p. 1792–1796, 1992.
- GOLDING, B.; SCOTT, D. E.; SCHARF, O.; HUANG, L. Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAN, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.*, v.3, p.43–48, 2001.
- GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 281-297, 2002.
- GROSS, A.; SPIESSER, S.; TERRAZA, A.; ROUOT, B.; CARON, E.; DORNAND, J. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect Immun.*, v. 66, p.1309–1316, 1999.
- GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J. Immunol.*, v.127, n.6, p. 2417-21, 1981.
- GRUENHEID, S.; GROS, P. Genetic susceptibility to intracellular infections: *Nramp1*, macrophage function and divalent cations transport. Review. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.3, p.43-48, 2000.
- GRUENHEID, S.; CANONNE-HERGAUX, F.; GAUTHIER, S.; HACKAM, D. J.; GRINSTEIN, S.; GROS, P. The iron transport protein *Nramp2* is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med.*, v. 189, p. 831–841, 1995.
- GUILLOTEAU, L. A.; DORNAND, J.; GROSS, A.; OLIVIER, M.; CORTADE, F.; VERN, Y.L.; KERBOEUF, D. *Nramp1* is not a major determinant in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.*, v.71, n.2, p.621-8, 2003.
- HARMON, B. G.; ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J. W.; SMITH, R. III. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows resistant infection after inoculation of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.4, p.459-65, 1989.
- HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Vet. J.*, v. 50, n. 3, p. 179-180, 1997.
- IBGE, Pesquisa da Pecuária Municipal 2008, Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2008/defaulttabzip.shtm>. Acesso em: 14\10\2010.
- JIANG, X.; LEONARD, B.; BENSON, R.; BALDWIN, C.L. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cel. Immunol.*, v. n. 151, p. 309–319, 1993.
- JIANG, X.; BALDWIN, C.L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, n. 61, p. 124–134, 1993.
- JONES, S. M.; WINTER, A. J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 3011–3014, 1992.

- KENNEDY, P. C.; MILLER, R. B. *The female genital system*. In: JUBB, K.V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Pathology of Domestic Animals, 4ed. cap. 4, San Diego: Academic Press, 1993, p. 484-489.
- KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, n. 1, p. 65-78, 2003.
- KO, J.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; FICHT, T. A.; SPLITTER, G. A. Virulence criteria for *Brucella abortus* strains as determined by interferon regulatory factor-1 deficient mice. *Infect. Immun.*, v. 70, p.7004-7012, 2002.
- KUDI, A. C; KALLA, D. J. U.; KUDI, M. C.; KAPIO, G. I. Brucellosis in camels. *J. Arid. Environ.*, v. 37, p. 413-417, 1997.
- KUMAR, N.; MITRA, A.; GANGULY, I. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)₁₃ microsatellite allele at 3'UTR of *NRAMP1* gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* x *Bos taurus*) cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 111, p. 139-143, 2005.
- LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P. Controle da brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 47, p. 30-41, 2005.
- LAGE, A.P.; POESTER F.P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA K. L. ; ALVES C M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. *Rev Bras Reprod Anim.*, v.32, n.3, p.202-212, 2008.
- LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 8, p. 60-66, 2005.
- LISSNER, C. R.; SWANSON, R. N.; O'BRIEN, A. D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J. Immunol.*, v.131, n.6, p.3006-3013, 1983.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D.; Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. v. 25, p.402-408, 2001.
- LOPEZ-GONI, I.; MORIYON, I.; NEILANDS, J. B. Identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid as a *Brucella abortus* siderophore. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 11, p. 4496-4503, 1992.
- LÓPEZ-URRUTIA, L.; ALONSO, A.; NIETO, M. L.; BAYON, Y.; ORDUNA, A. Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in ratperitoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v.68, p. 1740-1745, 2000.
- MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R. Níveis de anticorpos anti *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamentos de nelore. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.9, p. 1163-1168. 1984.
- MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide macrophage functions. *Annu. Rev. Immunol*, v. 15, p.: 323-350. 1997
- MARTINEZ, R.; TORO, R.; MONTOYA, F. Bovine *SLC11A1* 3' UTR SSCP

- genotype evaluated by a macrophage *in vitro* killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *J Anim Breed Genet*, v. 125, p. 271-9, 2008.
- MARTINEZ, R.; TORO, R.; MONTOYA, F. Evaluación genética para resistencia a brucelosis en ganado criollo colombiano BON. *Arch. Zootecnia*, v. 206, p. 333-340, 2005.
- MORENO, E.; MORIYÓN, I. The genus *Brucella*. In: Dworking, M., Falkow, S., Rosemberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. The Prokaryotes. Electronic version. Springer, New York, 2001.
- MEADOR, V. P.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Vet. Pathol.*, v. 26, n.5, p.357-68, 1989.
- MEADOR, V. P.; HAGEMOSER, W. A.; DEYOE, B. L. Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, n.2, p.274-80, 1988.
- MUFINDA, F. C.; KLEINB, C. H. Conhecimento de factores de risco e de profilaxia na transmissão da brucelose humana nos profissionais da pecuária na província do Namibe - Angola - 2009. *Rev Port Sau. Pub.*, v. 29, p. 88-95, 2011.
- NAESSENS, J.; TEALE, A. J.; SILEGHEM, M. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. Review. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 87, n.3-4, p.187-94, 2002.
- NEILANDS, J. B. Identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid as a *Brucella abortus* siderophore. *Infect Immun.*, v. 60, p. 4496-4503, 1992.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.24, p.69-95, 1980.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p.447-59, 2002.
- OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. A. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p.417-24, 2002.
- OLIVEIRA, S. C.; HARMS, J. S.; RECH, E. L.; RODARTE, R. S.; BOCCA, A. L.; GOES, A. M.; SPLITTER, G. A.. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 31, p.77-84, 1998.
- PAIXÃO, T. A., COSTA, E. A., XAVIER, M. N., SILVA, T. M. A, SANTOS, R. L. Innate immunity in brucellosis. In: *Res. Adv. Infect. Immun.* Kerala (Índia): Global Research Network, v.1, p. 21-37, 2009.
- PAIXÃO, T. A.; FERREIRA, C.; BORGES, A. M.; OLIVEIRA, D. A. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Frequency of bovine *Nramp1* (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 109, p. 37-42, 2006.
- PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; CARVALHO NETA, A. V.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. *Nramp1* 3'UTR polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 05, p. 2493-2499, 2007.

- PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P., AKRITIDIS, N., CHRISTOU, L., TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, v.6, p.91-99, 2006.
- PARKER, R. J.; SHEPHERD, R. K.; TRUEMAN, K. F.; JONES, G. W.; KENT, A. S.; POLKINGHORNE, I.G. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. *Vet. Parasitol.*, v.17, n.3, p.205-13, 1985.
- PAYNE, J. M. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 78, p. 447-463, 1959.
- PAYNE, S. M. Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.*, v.1, p. 66-69, 1993.
- PENA, M. T.; MILLER, J. E.; WYATT, W.; KEARNEY, M. T. Differences in susceptibility to gastrointestinal nematode infection between Angus and Brangus cattle in south Louisiana. *Vet. Parasitol.*, v.8, n.1-2, p.51-61, 2000.
- PERSSON, H. L.; ZHENGQUAN, Y.; TIROSH, O.; EATON, J. W.; BRUNK, U. T. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 34, p. 1295-1305, 2003.
- PARENT, M. A.; BELLAIRE, B. H.; MURPHY, E. A.; ROOP, R. M.; ELZER, Phillip H.; BALDWIN, C. L. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) facilitates intracellular survival of the bacteria. *Microbial Pathog.*, v.32, n5, p. 239-248, 2002.
- PEREIRA-SUÁREZ, A. L.; ESTRADA-CHÁVEZ, C.; ARRIAGA-DI'AZ, C.; ESPINOSA-CUETO, P.; MANCILLA, R. Coexpression of *Nramp1*, *iNOS*, and nitrotyrosine in bovine tuberculosis. *Vet Pathol.*, v.43, p.709-717, 2006.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; MEGE, J. L.; GORVEL, J. P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 2387-2392, 1998.
- PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. Review. *Microbes Infect.*, v. 2, n. 7, p. 829-835, 2000.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.55-62, 2002.
- POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L.; OLSEN, S. O.; SCHURIG, G. G.; LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v. 24, n. 25, p. 5327-5334, 2006.
- POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 47, p. 13-29, 2005.
- PORTE, F.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 4041-4047, 1999.
- PRICE, R .E.; TEMPLETON, J. W.; SMITH III, R.; ADAMS, L. G. Ability of

- phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.58, n.4, p.879-86, 1990.
- QURESHI, T.; TEMPLETON, J. W.; ADAMS, L. G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella Dublin* and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 50, p. 55-65, 1996.
- RATLEDGE, C. AND DOVER L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 54, p. 881-941, 2000.
- RECHAV, Y.; KOSTRZEWSKI, M. W. Relative resistance of six cattle breeds to the tick *Boophilus decoloratus* in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.58, n.3, p.181-86, 1991.
- ROGERS, R. J.; COOK, D. R.; KETTLERER, P. J.; BALDOCK, F. C.; BLACHALL, P. J.; STEWART, S. W. An Evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. *Aust. Vet. J.*, v. 66, p. 77-80, 1989.
- ROSSETTI, C. A.; GALINDO, C. L.; EVERTS, R. E.; LEWIN, H. A.; GARNER, H. R.; ADAMS, L. G. Comparative analysis of the early transcriptome of *Brucella abortus* – Infected monocyte-derived macrophages from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Res. Vet. Sci.*, 2010, doi:10.1016/j.rvsc.2010.09.002 (no prelo).
- SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n.3, p. 359-363, 1992.
- SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E.; WHATMORE, A. M.; QUANCE, C. R.; KOYLASS, M. S. L.; CUMMINS, B.; DICK JR, E. J.; SNIDER, C. L.; CAPPELLI, D.; EBERSOLE, J. L.; NATHANIELSZ, P. W.; HUBBARD, G. B. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. *J. Med. Primatol.*, v. 28, p. 70-73, 2009.
- SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S.; MELZER, F.; KAMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSSEN, E.; BAHN, P.; GOLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NOCKLER, KARSTEN. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 58, p. 375-382, 2008.
- SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.*, v. 60, p. 801-808, 2010.
- SERAFINO, J; CONDE, S.; ZABAL, O.; SAMARTINO, L. Multiplicación de *Brucella abortus* y producción de óxido nítrico en dos líneas celulares de macrófagos de distinto origen. *Ver. Arg. Microbiol.*, v.39, p. 193-198, 2007.
- SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L.

- Brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 47, p.1-12, 2005.
- SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P. Infection genomics: *Nramp1* as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu. Rev. Med.*, v.49, p.275-87, 1998.
- SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S. C.; CAREY, M.; MILLER, C.; KO, J.; COVERT, J. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.54, p. 309-319, 1996.
- TALESKI, V.; ZERVA, L.; KANTARDJIEV, T.; CVETNIC, Z.; ERSKI-BILJIC, M.; NIKOLOVSKI, B; BOSNJAKOVSKI, J.; KATALINIC-JANKOVIC, V; PANTELIADOU, A.; STOJKOSKI, S.; KIRANDZISKI, T. An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 147-155, 2002.
- TATUM, F.M., DETILLEUX, P.G.; SACKS, J.M.; HALLING, S. M. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect. Immun.*, v.60, p.2863-2869, 1992.
- TEMPLETON, J. W.; SMITH III, R.; ADAMS, L.G. Natural disease resistance in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.192, n.9, p.1306-1315, 1988.
- TILLER, R. V.; GEE, J. E.; LONSWAY, D. R.; GRIBBLE, S.; BELL, S. C.; JENNISON, A.V.; BATES, J.; COULTER, C.; HOFFMASTER, A. R.; DE, B. K. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 yearold patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol.*, v. 27, p. 10-23, 2010.
- TRUJILLO, I. Z., ZAVALA, A. N., CACERES, J. G., MIRANDA, C. Q. Brucellosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v.8, p.225-241, 1994.
- UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Aust.J. Agric. Res.*, v.29, p.885-895, 1978.
- VERGER, J. M. 1985. *B. melitensis* infection in cattle, p. 197-203. In J. M. Verger and M. Plommet (ed.), *Brucella melitensis*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; DEN HARTIGH, A. B.; TSOLIS, R. M.; SANTOS, R.L. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Vet. Sci. J.*, v. 4, p. 109-118, 2010.
- XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A.P.; SANTOS, R. L. Pathology, immunohistochemistry, and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.*, v. 140, p.149-157, 2009.
- WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. *Vet. Parasitol.*, v.77, p.63-70, 1998.
- WANG, M.; QURESHI, N.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. High levels of nitric oxide

production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. *Microb. Pathol.*, v. 31, n. 5, p. 221-230, 2001.

WEISS, D. S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A.; MORENO, E. MyD88, but not Toll like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 5137-5143, 2005.

WILESMITH, J. W. The persistence of *Brucella abortus* in calves: a retrospective study of heavily infected herds. *Vet. Rec.*, v. 103, p. 149-153, 1978.

WYCKOFF III, J. H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 395-415, 2002.

YOUNG, E. J. Human brucellosis. *Rev. Infect. Dis.*, v. 5, p. 821-842, 1983.

ZHAN, Y.; LIU, Z.; CHEERS, C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 2782-2786, 1996.