

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**O transportador ABC espécie-específico e o sistema de secreção do tipo IV de
Brucella ovis são essenciais para modulação do tráfego e sobrevivência intracelular
em macrófagos ovinos
(Tese)**

AURICÉLIO ALVES DE MACÊDO

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária- UFMG
2016**

Auricélio Alves de Macêdo

**O TRANSPORTADOR ABC ESPÉCIE-ESPECÍFICO E O SISTEMA DE
SECREÇÃO DO TIPO IV DE *BRUCELLA OVIS* SÃO ESSENCIAIS PARA
MODULAÇÃO DO TRÁFEGO E SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR EM
MACRÓFAGOS OVINOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Curso: Doutorado em Ciência Animal
Área de Concentração: Patologia Animal
Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos
Coorientadores: Profa. Dra. Tatiane Alves da Paixão e Dra. Juliana Pinto da Silva Mol

Belo Horizonte
Escola de Veterinária- UFMG
2016

M141t Macêdo, Auricélio Alves de, 1983-
O transportador ABC espécie-específico e o sistema de secreção do tipo IV de *Brucella ovis* são essenciais para modulação do tráfego e sobrevivência intracelular em macrófagos ovinos / Auricélio Alves de Macêdo. – 2016.
51 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Coorientadores: Tatiane Alves da Paixão, Juliana da Silva Mol

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Ovino – Doenças – Teses. 2. Brucelose em animais – Teses. 3. Macrófagos – Teses. 4. Patologia veterinária – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Paixão, Tatiane Alves da. III. Mol, Juliana da Silva. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

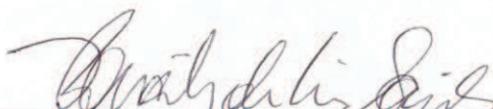
CDD – 636.308 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

AURICELIO ALVES DE MACEDO

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

Aprovada em 02 de Fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



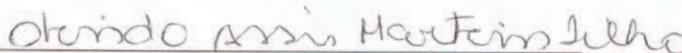
Prof. Renato de Lima Santos
Presidente - Orientador



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Escola de Veterinária - UFMG



Prof^a. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária- UFMG



Prof. Olindo Assis Martins Filho
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



Prof. Teane Milagres Augusto da Silva
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Dedico à minha família, em especial aos meus pais, João Franciso de Macedo e Maria Gracinete Alves de Lima e ao meu avô Raimundo Rodrigues de Lima (*in memorian*).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me dar forças nessa longa caminhada e pela fé inabalável que nos mantém vivos e fiéis à vida honesta de trabalho e estudo

A toda a minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A Ana Patrícia e sua família, pelo apoio, carinho e cuidado.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela sua excelência na capacitação de recursos humanos.

Ao Prof. Renato de Lima Santos, por sua dedicação, amizade, ensinamentos e conselhos durante o Mestrado e o Doutorado.

A Prof^a. Tatiane Alves da Paixão e Dra. Juliana Pinto da Silva Mol pela coorientação e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Dr Ermilton Junio, Dr Conrado Gamba, Prof^a. Érica Azevedo Costa e a Sra. Nelsa Moraes pela feliz convivência e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de Patologia Molecular pelo apoio, em especial a Cláudia Teane, Luciana, Juliana Mol, Luize, Kessler, Jade, Everton e Andreia.

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 por seus valiosos ensinamentos.

Aos colegas do setor de patologia pela feliz convivência.

Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/UFMG.

Aos eternos orientadores e amigos da Universidade Estadual do Maranhão Prof^a. Ana Lúcia Abreu Silva, Prof. Fábio Henrique, Prof. Ferdinan Melo e Prof^a. Alcina Vieira

Ao Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz, em especial aos Prof. Olindo Assis Martins Filho e Prof. Marcio Sobreira Araújo pelo apoio e colaboração durante algumas etapas desse trabalho.

Ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG pelo equipamento e suporte técnico nos experimentos de microscopia confocal.

Ao Centro de Microscopia da UFMG por providenciar o equipamento e o suporte técnico para os experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

A Fazenda Modelo em Pedro Leopoldo - MG e a Fazenda Experimental Professor Helio Barbosa em Igarapé - MG da Escola de Veterinária da UFMG por cederem os animais para coleta de material para a realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de estudos, além da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

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

Meu sincero muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. O GÊNERO <i>BRUCELLA</i>	15
3.2. INFECCÃO POR <i>BRUCELLA OVIS</i>	16
3.3. FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>BRUCELLA</i> spp.	18
3.4. TRÁFEGO INTRACELULAR DE <i>BRUCELLA</i> spp.	21
3.5. O MACRÓFAGO E A INFECCÃO POR <i>BRUCELLA</i> spp.	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. CEPAS BACTERIANAS, MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	23
4.2. ISOLAMENTO, CULTIVO E INFECCÃO DE MACRÓFAGOS OVINOS DERIVADOS DE MONÓCITOS.....	24
4.3. IMUNOCITOQUÍMICA.....	26
4.4. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	26
4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	27
4.6. MENSURAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.	27
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1. INTERNALIZAÇÃO E CINÉTICA DE SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE WT <i>BRUCELLA OVIS</i> , $\Delta ABCBA$ E $\Delta VIRB2$ EM MACRÓFAGOS OVINOS.....	28
5.2. TRÁFEGO INTRACELULAR DE <i>MCHERRY</i> -WT <i>BRUCELLA OVIS</i> , <i>MCHERRY</i> - $\Delta ABCBA$ E <i>MCHERRY</i> - $\Delta VIRB2$ EM MACRÓFAGOS OVINOS.....	32
5.3. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MACRÓFAGOS OVINOS INFECTADOS COM AS CEPAS WT <i>BRUCELLA OVIS</i> , $\Delta ABCBA$ OU $\Delta VIRB2$	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
9. ANEXOS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo.....	24
------------------	---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 .	Internalização e sobrevivência intracelular de WT <i>Brucella ovis</i>, $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos. Os dados representam a média e erro padrão (n = 6) de três experimentos independentes. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre a WT e mutantes (***) p<0,001).....	29
Figura 2 .	Imagem representativa da imunomarcação intracitoplasmática de WT <i>Brucella ovis</i>, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos. Os macrófagos foram infectados em uma <i>chamber slide</i> e, em seguida, imunomarcados às 8, 24 e 48 h após a infecção. Imunomarcação de WT <i>B. ovis</i> , $\Delta abcBA$, e $\Delta virB2$ (coloração castanha indicado pelas pontas de seta) se localiza no citoplasma de macrófagos ovinos contrastadas com hematoxilina de Mayer. As micrografias são representativas do tempo 8 hpi. Barra = 50 μ m.....	30
Figura 3.	Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos ovinos infectados com as cepas WT <i>Brucella ovis</i>, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$. Os macrófagos foram infectados durante 30 min., 24 e 48 h em uma <i>chamber slide</i> , fixados com glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato e processados para microscopia eletrônica de transmissão. (A) vacúolo citoplasmático contendo uma bactéria (seta) em macrófagos infectados com WT <i>B. ovis</i> 30 min pós-infecção; bar = 500 nm. (B) vacúolos contendo várias bactérias (seta) e bactérias degeneradas (cabeça de seta) em um macrófago infectado com cepa mutante $\Delta abcBA$ de <i>B. ovis</i> 30 min pós-infecção; barra = 1 μ m. (C) figuras de mielina em um macrófago infectado com a cepa mutante $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> 30 min após a infecção; bar = 500 nm. (D) vacúolo contendo bactérias fundido com lisossomo, caracterizado por um teor ligeiramente eletrondenso dentro do vacúolo (seta), em um de macrófago infectado com $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> 30 min pós-infecção; bar = 500nm. (E) bactérias degeneradas associadas às figuras de mielina (seta) em um macrófago infectado com a cepa mutante $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> 24 hpi; bar = 500 nm. (F) macrófagos infectados com a cepa mutante $\Delta abcBA$ de <i>B. ovis</i> 48 hpi sem quaisquer bactérias intracelulares; barra = 1 μ m.....	31
Figura 4.	Curva de crescimento <i>in vitro</i> das cepas <i>mCherry</i>-WT <i>Brucella ovis</i>, <i>mCherry</i>-$\Delta abcBA$, e <i>mCherry</i>-$\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i>. As cepas foram cultivadas em placas de TSA com 1% de hemoglobina a 37°C em 5% de CO ₂ . Dados representam a média e o erro padrão de três experimentos independentes.....	33
Figura 5.	Cinética de infecção em macrófagos ovinos das cepas <i>mCherry</i>-WT <i>Brucella ovis</i>, <i>mCherry</i>-$\Delta abcBA$, e <i>mCherry</i>-$\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i>. Os dados representam a média e o erro padrão (n = 6) de três experimentos independentes. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre a WT e mutantes (***) p<0,001).....	34
Figura 6.	Tráfego intracelular de WT <i>Brucella ovis</i>, $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos LAMP-1. (A) Imagens representativas de microscopia confocal de macrófagos ovinos expressando LAMP-1 e infectados cepas <i>mCherry</i> -WT <i>B. ovis</i> , <i>mCherry</i> - $\Delta abcBA$, e <i>mCherry</i> - $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> . (B) Percentual médio de VCB que foram positivas para LAMP-1 durante a infecção. (C) Número médio de bactérias por célula (total de 100 células por tempo) ao longo da infecção. (D) cinética de infecção <i>mCherry</i> -WT <i>B. ovis</i> , <i>mCherry</i> - $\Delta abcBA$, e <i>mCherry</i> - $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> em macrófagos ovinos expressam LAMP-1 por transdução transitória (ver seção Material e métodos). Os dados representam a média e o erro padrão de pelo menos 100 células a partir de três experimentos independentes (** p<0,01; *** p<0,001)...	35
Figura 7.	Tráfego intracelular de WT <i>Brucella ovis</i>, $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos expressando calreticulina. (A) Imagens representativas de microscopia confocal de macrófagos ovinos expressando calreticulina e infectados cepas <i>mCherry</i> -WT <i>B. ovis</i> , <i>mCherry</i> - $\Delta abcBA$, e <i>mCherry</i> - $\Delta virB2$ de <i>B. ovis</i> . (B)	

	Percentual médio de vacúolos contendo <i>Brucella</i> que foram positivas para calreticulina durante a infecção. (C) Número médio de bactérias por célula (total de 100 células por tempo) ao longo da infecção. (D) cinética de infecção <i>mCherry</i> -WT <i>B. ovis</i> , <i>mCherry-ΔabcBA</i> , e <i>mCherry-ΔvirB2</i> de <i>B. ovis</i> em macrófagos ovinos expressam calreticulina por transdução transitória (ver seção Material e métodos). Os dados representam a média e o erro padrão de pelo menos 100 células a partir de três experimentos independentes (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).....	36
Figura 8.	Produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados com WT <i>Brucella ovis</i>, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$. Os macrófagos foram marcados com a sonda DAF-2 durante 1 h e analisados por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência média (IMF). LPS de <i>E. coli</i> (1 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado para estimular os macrófagos como controle positivo. Macrófagos não infectados foram usados como controle negativo (CN). As barras representam a média e erro padrão de três experimentos independentes. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre WT e mutantes (* $p < 0,05$).....	37
Figura 9 .	Produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos infectados com as cepas WT <i>Brucella ovis</i>, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$. Os macrófagos foram marcadas com a sonda CellRox Deep Red durante 1 h e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência média (IMF). LPS de <i>E. coli</i> (1 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado para estimular os macrófagos como controle positivo. Macrófagos não infectados foram usados como controle negativo (CN). As barras representam a média e erro padrão de três experimentos independentes. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre WT e mutantes (* $p < 0,05$).....	38

RESUMO

Infecção por *Brucella ovis* é associada à epididimite, orquite e infertilidade em carneiros. As informações disponíveis sobre *B. ovis* e sua interação com células hospedeiras foram geradas com macrófagos murinos ou linhagens de células epiteliais humanas, mas a interação entre *B. ovis* e macrófagos primários ovinos nunca foi estudada. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do transportador ABC codificado pelo gene *abcEDCBA* de *B. ovis* e o sistema de secreção do Tipo IV (SST4) codificado pelo operon *virB* durante a sobrevivência intracelular de *B. ovis* em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de ovinos. As cepas mutantes $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ de *B. ovis* foram incapazes de sobreviver no ambiente intracelular quando comparado com a cepa selvagem (WT) de *B. ovis* às 48 horas pós-infecção (hpi). Além disso, estas cepas mutantes não foram capazes de excluir o marcador lisossomal LAMP-1 da membrana de seus vacúolos e seus vacúolos não adquiriram o marcador de retículo endoplasmático calreticulina, ao passo que esse marcador estava presente no vacúolo contendo WT *B. ovis*. Níveis mais altos de produção de óxido nítrico (NO) foram observados em macrófagos infectados com WT *B. ovis* no tempo de 48 hpi quando comparados com macrófagos infectados com as cepas mutantes $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$. Por outro lado, níveis mais elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram detectadas em macrófagos infectados com os mutantes $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ 48 hpi quando comparados aos macrófagos infectados com a cepa WT. Nossos resultados demonstram que *B. ovis* é capaz de persistir e de se multiplicar em macrófagos ovinos, enquanto que mutações que provocam a perda de funcionalidade do transportador ABC e do SST4 impedem a multiplicação intracelular, favorecem a fusão do fagolisossoma e prejudicam a maturação do vacúolo de *B. ovis* para um compartimento com características de retículo endoplasmático rugoso.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, macrófago, ovino, LAMP-1, calreticulina.

ABSTRACT

Brucella ovis infection is associated with epididymitis, orchitis and infertility in rams. Information available on *B. ovis* and host cell interaction have been generated using murine macrophages or human epithelial cell lines, whereas the interaction between *B. ovis* and primary ovine macrophages has never been studied. The aim of this study was to evaluate the role of the *B. ovis abcEDCBA*-encoded ABC transporter and the *virB* operon-encoded Type IV Secretion System (T4SS) during intracellular survival of *B. ovis* in ovine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *B. ovis* $\Delta abcBA$ and $\Delta virB2$ mutant strains were unable to survive in the intracellular environment when compared to the WT *B. ovis* at 48 hours post infection (hpi). In addition, these mutant strains cannot exclude the lysosomal marker LAMP-1 from its vacuolar membrane, and their vacuoles did not acquire the endoplasmic reticulum marker calreticulin, which takes place in the WT *B. ovis* containing vacuole. Higher levels of nitric oxide production were observed in macrophages infected with WT *B. ovis* at 48 hpi when compared to macrophages infected with the $\Delta abcBA$ or $\Delta virB2$ mutant strains. Conversely, higher levels of reactive oxygen species were detected in macrophages infected with the $\Delta abcBA$ or $\Delta virB2$ mutant strains at 48 hpi when compared to macrophages infected with the WT strain. Our results demonstrate that *B. ovis* is able to persist and multiply in ovine macrophages, while $\Delta abcBA$ and $\Delta virB2$ mutations prevent intracellular multiplication, favor phagolysosome fusion, and impair maturation of the *B. ovis* vacuole towards an endoplasmic reticulum-derived compartment.

Key words: *Brucella ovis*, macrophage, ovine, LAMP-1, calreticulin.

1. INTRODUÇÃO

Brucelose inclui um grupo de doenças que resulta da infecção por diferentes agentes patogênicos do gênero *Brucella* (Xavier et al., 2009; Poester et al., 2013). Na maioria dos casos, é uma doença zoonótica, associada com infecção crônica em animais e seres humanos. A brucelose é responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária (Santos et al., 2013), e é endêmica em vários países, particularmente nos países em desenvolvimento (Corbel, 1997; Boschioli et al., 2001).

Brucella ovis é um cocobacilo Gram-negativo estavelmente rugoso, não encapsulado, não esporulado, que pertence à família alfa-2-Proteobacteriaceae (Burgess, 1982). Brucelose ovina causada por *B. ovis* tem distribuição mundial em todas as áreas onde a ovinocultura tem importância econômica (Carpenter et al., 1987). A infecção por *B. ovis* é caracterizada por epididimite unilateral nos machos (ou bilateral, embora menos comum) e degeneração e/ou a atrofia testicular, que podem resultar em infertilidade, causando grandes perdas econômicas (Xavier et al., 2010; Carvalho Junior et al., 2012; Silva et al., 2013). Em ovelhas, a infecção por *B. ovis* pode levar ao aborto ou nascimento de crias fracas, levando à morte perinatal. Entretanto, *B. ovis* não tem sido associada às infecções em seres humanos, sendo uma das poucas espécies do gênero *Brucella* que não é considerada zoonótica (Blasco, 1990).

Vários fatores de virulência de *Brucella* spp. que são importantes para o estabelecimento da infecção em animais têm sido estudados. Por exemplo, o sistema de secreção do tipo IV (SST4) codificado pelo operon *virB* é necessário para a sobrevivência e multiplicação intracelular, desempenhando um importante papel no tráfego intracelular de *Brucella* spp. O SST4 modula a maturação do vacúolo contendo *Brucella* (VCB), inibindo a sua fusão com lisossomos e dirigindo o VCB no sentido de um vacúolo que contém características do retículo endoplasmático rugoso, o nicho intracelular de multiplicação de *Brucella* spp. (O'Callaghan et al., 1999; Celli et al., 2003; Starr et al., 2008). A inativação do SST4 resulta em forte atenuação de *Brucella* spp., incluindo *B. ovis*, seja *in vitro* em células, *ex vivo* em explantes de tecidos infectados ou *in vivo* em modelos animais de infecção (O'Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; den Hartigh et al., 2004; Sá et al., 2012; Mol et al., 2014).

Tsolis et al. (2009) identificaram uma ilha genômica no cromossomo II de *B. ovis* que é ausente em outras espécies clássicas de *Brucella*, posteriormente nomeada como ilha de patogenicidade 1 de *B. ovis* (BOPI-1), uma vez que codifica os genes que estão associados à sua patogenicidade (Silva et al., 2011). Por exemplo, a deleção de dois genes que codificam componentes de um possível transportador ABC (*ATP-binding cassette*) de ligação de ATP (BOV_A0504-BOV_A0500, chamado *abcEDCBA*) resultou em atenuação significativa de *B. ovis* em camundongos (Silva et al., 2011) e carneiros (Silva et al., 2013). Foi recentemente descrito que o transportador ABC codificado pelos genes *abcEDCBA* interferem na expressão do SST4 a um nível pós-transcricional (Silva et al., 2014).

Brucella spp. têm a capacidade de sobreviver e multiplicar intracelularmente em macrófagos e células não fagocíticas (Thoen et al., 1993). Os macrófagos são peça-chave para a imunidade inata, mas também desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imunológica adquirida protetora contra *Brucella* (Eskra et al., 2003). No entanto, os macrófagos também são importantes para a persistência de *Brucella* spp. no hospedeiro (Gorvel e Moreno, 2002; Macedo et al., 2013). Portanto, estudos experimentais em macrófagos primários infectados com *Brucella* são importantes para uma compreensão completa dos mecanismos de patogênese e virulência desta bactéria, bem como a resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, todas as informações publicadas sobre patogênese de *B. ovis* são baseadas em macrófagos murinos ou linhagens de células epiteliais (Silva et al., 2011, Sá et al., 2012; Silva et al., 2014), e não há estudos que avaliam a interação da *B. ovis* com macrófagos do seu hospedeiro preferencial, que é um passo essencial para a validação experimental dos resultados obtidos com linhagens celulares, particularmente porque *B. ovis* é uma das espécies mais hospedeiro-restrito do gênero *Brucella* spp (Xavier et al., 2010).

2. OBJETIVOS

Considerando a hipótese de que o transportador ABC e o SST4 de *B. ovis* são essenciais para a sua sobrevivência intracelular em macrófagos ovinos, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o papel de um transportador ABC espécie-específico e do SST4 na sobrevivência e tráfego intracelular de *B. ovis* em macrófagos ovinos derivados de monócitos. Para alcançar este objetivo, os objetivos específicos foram:

- (i) avaliação da cinética de infecção de *B. ovis* em macrófagos ovinos em comparação com os mutantes $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$;
- (ii) caracterização do tráfego intracelular de *B. ovis* e dos mutantes $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$;
- (iii) mensuração da magnitude de resposta microbicida do macrófago ovino durante a infecção de *B. ovis* em comparação com os mutantes $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GÊNERO *BRUCELLA*

A brucelose é uma importante zoonose causada por bactérias pertencentes ao gênero *Brucella*, que acomete grande variedade de espécies animais e gera impacto econômico negativo para a pecuária em áreas endêmicas devido a abortos, redução na produção leiteira, subfertilidade e infertilidade (Santos et al., 2013; McDermott et al., 2013).

As seis espécies clássicas de *Brucella* foram identificadas ao longo de 100 anos desde o século XIX. A primeira espécie do gênero *Brucella* foi isolada por David Bruce pela primeira vez em 1887, de baço de militares que morreram na costa do Mediterrâneo portadores de uma enfermidade denominada de Febre de Malta (Bruce, 1887). Inicialmente, o microrganismo foi denominado de *Micrococcus melitensis* e depois

recebeu o nome de *Brucella melitensis* em homenagem a David Bruce. Cerca de 10 anos após a descoberta de Bruce, Bernhard Bang, um veterinário dinamarquês, isolou um agente infeccioso de um feto bovino abortado, inicialmente denominado *Bacillus abortus* e, mais tarde, renomeada para *Brucella abortus* (Hall, 1989, Meyer, 1990). Em seguida, *B. suis* foi isolada em 1914, por Jacob Traum, de um leitão abortado (Moreno e Moriyón, 2006) e, *B. ovis*, foi descrita pela primeira vez por McFarlane et al. (1952), na nova Zelândia. Em 1957, *B. neotomae* foi isolada de roedores do deserto por Stoenner nos Estados Unidos da América (Stoenner e Lackman, 1957) e *B. canis* foi descrita por Carmichael em 1969 acometendo cães (Carmichael e Bruner, 1968).

Bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos Gram-negativos, que medem 0,5 a 0,7 por 0,7 a 1,2 μm , intracelulares facultativos, não encapsulados, pertencentes à família α -Proteobacteriaceae, capazes de infectar vários tipos celulares, como células trofoblásticas, células dendríticas e macrófagos (Gorvel, 2008).

Cada espécie de *Brucella* demonstra ter maior afinidade por hospedeiros mamíferos específicos, embora a maioria seja capaz de infectar outros hospedeiros (Boschioli et al., 2001). Alguns trabalhos sugerem que o gênero *Brucella* seja monoespecífico, sustentado no fato de que a variação genética entre as espécies é muito pequena (Verger et al., 1985; Rajashekara et al., 2004). São reconhecidas seis espécies clássicas de *Brucella*: *B. melitensis*, cujos hospedeiros preferenciais são ovinos e caprinos; *B. abortus* em bovinos; *B. suis* em suínos; *B. ovis* em ovinos; *B. canis* em caninos; *B. neotomae* em roedores selvagens. Todas estas espécies clássicas são patogênicas para o homem, exceto *B. neotomae* e *B. ovis* (Godfroid et al., 2005). Além destas existem as espécies não clássicas de *Brucella*: *B. ceti* que acomete cetáceos; *B. pinnipedialis* em pinípedes; *B. inopinata*, isolada de implante mamário e biópsia de pulmão de humanos; *B. microti* em roedores; *B. papionis*, isolada do útero de babuínos (Whatmore et al., 2014) e uma espécie de *Brucella* ainda não nomeada isolada de um sapo (Eisenberg et al., 2012).

Em humanos, a brucelose caracteriza-se por febre recorrente, emagrecimento, artrite, meningite, endocardite, espondilite e menos comumente alterações reprodutivas. Entretanto, nos animais domésticos, a brucelose comumente causa aborto, epididimite, infertilidade e nascimento de crias fracas (Hartigan, 1997; Franco et al., 2007; Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010).

3.2 INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS*

B. ovis é um cocobacilo pertencente ao gênero *Brucella*, que pode sobreviver e multiplicar dentro de fagócitos profissionais e não profissionais. É considerada não patogênica para o homem, porém causa infecção crônica em ovinos (Burguess, 1982).

É o patógeno mais importante do trato reprodutor de carneiros, com tropismo, principalmente para o epidídimo, causando falhas reprodutivas (Carvalho Junior et al., 2012). Geralmente, há epididimite unilateral, acometendo principalmente a cauda do

epidídimo, podendo se estender ao corpo e à cabeça (Walker et al., 1986; Ficapal et al., 1998). Associada a esta alteração, há edema perivascular e infiltração de linfócitos associado à fibrose. Raramente os testículos são afetados, porém, em casos mais graves de infecção, podem apresentar-se atrofiados e flácidos. Apesar de serem observadas mais frequentemente lesões unilaterais nos epidídimos, ambos também podem ser afetados (Bulgin, 1990). Lesões secundárias são decorrentes de obstrução do ducto epididimário, acarretando retenção do conteúdo. Se houver extravasamento do conteúdo, há inflamação crônica associada à fibrose, caracterizando o granuloma espermático (Carvalho Junior et al., 2012). Ampola e glândula vesicular também podem ser afetadas, até mesmo sem ter lesões ou bactérias no epidídimo, sugerindo que *B. ovis* pode ter um tropismo por estes órgãos (Biberstein et al., 1964; Carvalho Junior et al., 2012; Silva et al., 2015).

Ocasionalmente é observado aborto em ovelhas infectadas com *B. ovis*, assim como aumento da mortalidade perinatal e nascimento de cordeiros fracos (Molello et al., 1963; Ficapal et al., 1998). Carneiros jovens, entre quatro e seis meses de idade podem ser infectados (Burgess, 1982; Bulgin, 1990), o que deve ser levado em consideração durante a implementação de programas de controle e prevenção da doença. Na maioria das vezes, o patógeno é introduzido no rebanho através da compra de machos infectados. Dessa forma, os outros machos do rebanho se infectam pelo contato direto com mucosas daqueles infectados (por exemplo, comportamento de cheirar ou lambar a urina do animal infectado e comportamento homossexual) ou durante a estação de monta ao ter contato com fêmeas que tiveram contato prévio com machos infectados (Bulgin, 1990; Ridler e West, 2011).

Após a entrada do patógeno no organismo, a bactéria segue no interior de fagócitos ou livres em direção aos linfonodos regionais, que se tornam aumentados devido à hiperplasia linfóide e inflamação. Assim, a bactéria se dissemina para vários órgãos, como baço, fígado e linfonodos, incluindo o trato genital. Essas alterações frequentemente levam algumas semanas para ocorrer, podendo persistir por vários meses inclusive com a eliminação do patógeno pelo sêmen por um longo período (Ridler et al., 2006, 2014; Xavier et al., 2010; Silva et al., 2013).

Clinicamente, carneiros afetados têm libido normal, porém a qualidade do sêmen pode variar. É comum que carneiros infectados não apresentem sinais clínicos da doença, na verdade menos de 50% de carneiros com sorologia positiva para *B. ovis* apresentam sinais clínicos (Blasco 1990; Xavier et al., 2010; Silva et al., 2013). Estes, quando presentes, podem desaparecer após algumas semanas de infecção (Plant et al., 1986), entretanto, há comprovação de que esses animais continuam eliminando *B. ovis* no sêmen (Hughes e Claxton, 1968), servindo como disseminadores da doença no rebanho.

Uma forma simples e muito utilizada para investigar a infecção por *B. ovis* é através da avaliação do sêmen, verificando a eliminação de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (Carvalho Junior et al., 2012; Silva et al., 2015). Para o diagnóstico laboratorial, apesar de *B. ovis* ser um microrganismo que requer condições e meios de

cultivo específicos, o exame bacteriológico do sêmen e da urina é capaz de isolar esse agente (Xavier et al., 2010; Silva et al., 2013). Testes sorológicos, como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (Ficapal et al., 1995), fixação de complemento (Ridler et al., 2014), *immunoblotting* (Kittelberger et al., 1997) e ELISA (França et al., 2014), também podem ser utilizados para o diagnóstico da brucelose ovina causada por *B. ovis*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) do sêmen e da urina de ovinos, utilizando primers específicos de *B. ovis*, também pode ser utilizado para diagnóstico, constituindo um método mais sensível e mais específico que os citados anteriormente (Xavier et al., 2010).

3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *BRUCELLA* spp.

Fatores de virulência são caracterizados por conferir à bactéria capacidade de invasão, multiplicação e sobrevivência em células do hospedeiro, estando associados, assim, diretamente à patogenicidade da bactéria (Gorvel e Moreno, 2002).

Em *Brucella* spp., fatores clássicos de virulência, tais como exotoxinas, exoenzimas, fimbrias, flagelos ou cápsula não foram descritos ainda. Assim, alguns determinantes antigênicos têm destaque durante a invasão, internalização e trânsito celular de *Brucella* spp. (Olsen et al., 2004). O lipopolissacarídeo (LPS), SST4, sistema de dois componentes BvrS:BvrS e o sistema transportador ABC são os principais fatores de virulência associados à *Brucella* spp. (Gorvel e Moreno, 2002; López-Goñi et al., 2002; Rosinha et al., 2002; Lapaque et al., 2005).

O LPS é um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, composto por lipoproteína A, um oligossacarídeo e uma cadeia distal O de polissacarídeo. *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* têm morfologia lisa, com todas as camadas do LPS intactas, porém *B. ovis* e *B. canis* não possuem a cadeia O, assim, são espécies naturalmente rugosas (Godfroid et al., 2000).

Amostras de *Brucella* de morfologia lisa têm a habilidade de invasão de células do hospedeiro associada à cadeia O do LPS, por isso, esta é considerada um determinante molecular de virulência, mesmo existindo algumas espécies de *Brucella* com morfologia rugosa naturalmente virulentas (Sola-Landa et al., 1998; Ko e Splitter, 2003). A descoberta do LPS como um fator de virulência se deu através de experimentos que demonstraram que havia reduzida imunogenicidade desta molécula e deficiência na ativação da via alternativa do complemento (Sangari e Agüero, 1996).

Além de favorecer a sobrevivência extracelular, o LPS liso é capaz de atrasar a maturação do fagossomo, inibir a fusão do fagolisossomo e apoptose de macrófagos, proporcionando, assim, a sobrevivência e multiplicação intracelular de *Brucella* no hospedeiro (Lapaque et al., 2005).

Existem estruturas que compõem a membrana externa de *Brucella* e que contribuem na invasão celular e no potencial imunogênico (Vizcaíno et al., 1996; Rossetti et al., 2009). Estas estruturas são as proteínas de membrana externa (OMPs). As principais OMPs

relatadas em *Brucella* são Omp31, Omp19, Omp25 e Omp22, sendo expostas na superfície da *Brucella* (Cloeckaert et al., 1992; Vizcaíno et al., 1996). Nas espécies de *Brucella* com LPS liso, as OMPs são pouco expostas aos anticorpos quando comparadas às espécies de *Brucella* com LPS rugoso, devido à extensa cadeia O do LPS (Bowden et al. 1995). A deleção dos genes *omp25* e da *omp31* de *B. ovis* não interferiu na multiplicação intracelular em macrófago murino ou em células HeLa, porém a deleção de *omp22* resultou na atenuação do patógeno (Martín-Martín et al., 2008).

A secreção de proteínas é um dos mais importantes fatores de virulência de bactérias patogênicas e o sistema de secreção exerce função essencial na interação patógeno/hospedeiro (Lee et al., 2006). As bactérias secretam proteínas por meio de numerosos tipos de sistemas de secreção classificados de tipo I ao tipo VI.

Em *Brucella* spp., existe um complexo de proteínas, na membrana externa, que transporta macromoléculas para o meio extracelular, denominada de SST4 (O'Callaghan et al., 1999; Boschioli et al., 2002). Este é um dos principais fatores de virulência da *Brucella* associado à sobrevivência e multiplicação intracelular. O TSS4 de *Brucella* é codificado por um operon (*virB*) composto por 12 genes (*virB1* a *virB12*). Os genes *virB1* a *virB11* são conservados (possuem genes ortólogos no SST4 de outras bactérias), entretanto, o *virB12* está presente somente no gênero *Brucella* (O'Callaghan et al., 1999). O SST4 é responsável pela maturação do vacúolo contendo *Brucella* sp. e impede a fusão do fagossomo com o lisossomo. Assim, o patógeno consegue alcançar o retículo endoplasmático e se multiplica tanto em fagócitos quanto em células não fagocíticas (Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Celli et al., 2003). Estrudos demonstraram que cepas que tenham deleção desse sistema não têm capacidade de se multiplicar em macrófagos e em células epiteliais, consequentemente estabelecem infecção nos primeiros dias, mas não persistem (Hong et al., 2000; Sá et al., 2012).

Existem diversos sinais que regulam a expressão do operon *virB*, como por exemplo acidez do ambiente, restrição nutricional e densidade populacional. As proteínas reguladoras têm a capacidade de responder aos sinais do ambiente e de coordenar a expressão do TSS4 durante a infecção. Existem duas proteínas envolvidas nesse processo: fator de integração do hospedeiro (IHF) e proteína reguladora de utilização de histidina (HutC). O IHF está relacionado à sobrevivência intracelular e a HutC está associado à indução da expressão do TSS4 (Sieira et al., 2004; Sieira et al., 2010; Sieira, 2013). Além destas proteínas, o sistema regulatório de dois componentes (BvrR/BvrS) também regula os genes *virB* em *Brucella* spp, sendo capaz de se ligar diretamente à região promotora do *virB* (Martínez-Núñez et al., 2010). O BvrR:BvrS regula a expressão de genes que codificam OMPs relacionadas à invasão. É constituído por uma proteína sensorial da super família histidina-kinase (BvrS) e uma proteína regulatória (BvrR) (López-Goñi et al., 2002). Cepas com deficiência desses genes não conseguem recrutar GTPases e polimerizar a actina, sendo impedida, assim, a invasão da bactéria na célula hospedeira. Além disso, a ausência desse sistema impede o escape do mecanismo

de fusão do fagolisossomo, demonstrando que este sistema é importante para invasão e sobrevivência intracelular de *Brucella* spp. (López-Goñi et al., 2002).

Os sistemas transportadores do tipo ABC ("ATP binding cassette") são considerados um fator de virulência identificado no gênero *Brucella*. São compostos por duas proteínas de membrana (que possuem segmentos transmembrana), proteínas de ligação, proteínas que hidrolisam o ATP e proteínas que se ligam a um substrato específico e são caracterizados pelo transporte ativo transmembrânico (Rosinha et al., 2002; Jenner et al., 2009; Silva et al., 2011). Apesar de múltiplas e diversificadas funções, esses sistemas podem transportar íons, aminoácidos, peptídeos, ferro e sulfato para o interior da bactéria e exportar antibióticos, ácidos graxos e toxinas (Tam e Saier, 1993; Ko e Splitter, 2000). Em sua maioria, os transportadores ABC são do tipo exportadores, embora, em células procariontas, possam atuar como importadores de nutrientes devido a presença de proteínas ligadoras de substrato (PLS) localizadas no periplasma (van der Heide e Poolman, 2002).

Estudos das regiões genômicas que codificam transportadores ABC em espécies clássicas de *Brucella* resultou na classificação dos sistemas em três grupos de acordo com suas funções: sistema de exportação, sistema de resistência a antibiótico e sistema de importação, este último correspondente a maior quantidade dos transportadores ABC de *Brucella* spp. (Jenner et al., 2009).

Vários genes codificam transportadores ABC no gênero *Brucella*, sendo que esses genes constituem cerca 8,8% do seu genoma e que, possivelmente, sejam importantes para a sua sobrevivência em condições adversas (Jenner et al., 2009). Interessantemente, *B. ovis* possui o menor número de proteínas transportadoras e são incapazes de importar vários nutrientes quando comparada às outras espécies do gênero *Brucella*, uma vez que vários genes da região genômica envolvida na codificação de sistemas ABC são pseudogenes (Jenner et al., 2009; Tsolis et al., 2009). No entanto, estudos de proteômica têm apontado que muitos dessas sequências apontadas como pseudogenes são expressas e potencialmente codificam proteínas funcionais (Silva et al., 2014).

A deleção de um gene envolvido no transporte de polissacarídeo em *B. abortus* resultou em forte atenuação *in vivo* em modelos murino de infecção (Rosinha et al., 2002). Por outro lado, trabalhos descrevem que outros transportadores ABC de *B. abortus* não são necessários para sobrevivência intracelular e estabelecimento de infecção crônica *in vivo* (Ko e Splitter et al., 2000; Danese et al., 2004). Em *B. ovis*, estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a função de um transportador ABC específico desta espécie (*abcEDCBA*), embora ainda não se saiba ao certo qual a real função deste loci e qual molécula é transportada. A deleção desse transportador ABC resultou em forte atenuação tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos murinos de infecção (Silva et al., 2011). Um estudo revelou que os genes *abcEDCBA* são necessários para expressão *in vitro* de outros sistemas ABC e proteínas de virulência de *B. ovis* (incluindo Omp31 e superóxido dismutase), assim como a sua sobrevivência intracelular e evasão da fusão do fagossomo com o lisossomo, interferindo na expressão de proteínas do SST4 (Silva

et al., 2014). Camundongos infectados com esta cepa, encapsulada com alginato, não apresentaram alterações histopatológicas significativas no baço, fígado ou órgão reprodutores e, em 24 horas após a infecção (hpi), houve mínima recuperação desta cepa mutante no baço e fígado destes animais (Silva et al., 2015a). Além disso, em carneiros, hospedeiros preferenciais de *B. ovis*, esta cepa induziu uma resposta imune celular e humoral eficiente e não foi eliminada no sêmen ou na urina dos carneiros durante seis meses de infecção (Silva et al., 2013). Esta mesma cepa, viva e atenuada de *B. ovis* encapsulada ou não com alginato confere proteção a carneiros contra a cepa selvagem de *B. ovis* (Silva et al., 2015b).

3.4 TRÁFEGO INTRACELULAR DE *BRUCELLA* spp.

Brucella spp. sobrevive e multiplica em fagócitos profissionais, não profissionais e em células não fagocíticas. *In vitro* também é capaz de se multiplicar em macrófagos e em células epiteliais e infectar cultivo primário de células trofoblásticas, macrófagos humanos e macrófagos de hospedeiros naturais (Celli et al., 2003; Carvalho Neta et al., 2008; Silva et al., 2011; Macêdo et al., 2013; Salcedo et al., 2013).

Uma vez internalizada, a *Brucella* permanece em um compartimento ligado à membrana da célula hospedeira, denominado VCB, um fagossomo modificado em que a bactéria sobrevive e multiplica. A estratégia de sobrevivência intracelular tem sido bastante investigada em experimentos envolvendo o tráfego do VCB em macrófagos e em células epiteliais (Celli et al., 2003; Comerci et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998). Os VCB adquirem então marcadores temporários endossomais, como Rab5 (uma pequena molécula ligada à GTP) e um antígeno do endossomo inicial (EEA-1) (Pizarro-Cerda et al., 2000; Celli, 2006). Posteriormente, os VCB interagem temporariamente com os lisossomos, resultando na acidificação e maturação destes, que é primordial para a ativação do SST4 (Porte et al., 1999; Celli et al., 2003).

Através da imunofluorescência e da microscopia eletrônica foi possível observar que o VCB assim que formado, interage com os primeiros compartimentos da via endocítica antes de adquirir e reter LAMP-1 (proteína de membrana associado ao lisossomo) por até 12 hpi (Celli et al., 2003; Comerci et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998). A fusão com o lisossomo gera marcação positiva de VCB para LAMP-1, além de compartimentos com múltiplas membranas, interpretados como fagolisossomos (Pizarro-Cerda et al., 1998; Moreno e Moriyón, 2006; Starr et al., 2008). De 12 a 24 horas após a internalização, os VCB evadem dos lisossomos e se fundem à membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER), permitindo que a *Brucella* alcance seu nicho ideal de multiplicação (Pizarro-Cerdá et al., 2000; Celli et al., 2003; Starr et al., 2008). Este processo depende da integridade funcional do SST4 (Celli et al., 2003; Comerci et al., 2001; O'Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000; Delrue et al., 2001). Nesse estágio, o VCB perde os marcadores lisossomais e torna-se positivo para marcadores específicos de RER (calreticulina, calnexina e sec61 β) (Pizarro-Cerdá et al., 1998; Celli et al., 2003; Moreno e Moriyón, 2006).

Pesquisas aplicadas à investigação do comportamento intracelular de *B. ovis* demonstraram que em células HeLa, a cepa selvagem de *B. ovis* é capaz de sobreviver e se multiplicar até 48 hpi, ao passo que o mutante *abcBA* de *B. ovis* é atenuado já às 24 hpi. Durante a análise confocal, observou-se que a maioria da cepa selvagem de *B. ovis* escapou do compartimento LAMP-1⁺ 48 hpi, entretanto aproximadamente 90% da cepa mutante *abcBA* de *B. ovis* estava colocalizada com LAMP-1⁺. Dessa forma, *B. ovis* é capaz de escapar da fusão fagolisossomal, enquanto que o mutante $\Delta abcBA$ de *B. ovis* se manteve no lisossomo, não sobrevivendo em células HeLa assim como observado no macrófago murino.

3.5 O MACRÓFAGO E A INFECÇÃO POR *BRUCELLA* spp.

Células apresentadoras de antígeno como o macrófago, possuem uma importante função na defesa durante um processo infeccioso, além de interligar as respostas imunológicas inata e adaptativa (Benoit et al., 2008).

Apesar dos macrófagos serem considerados células efetoras essenciais do sistema imunológico, estes também possuem outra função muito importante que é a remoção de restos celulares, mantendo assim o equilíbrio do tecido. Como células sentinelas, os macrófagos são capazes de identificar sinais de danos causados por patógenos através dos receptores do tipo *toll* (TLR), receptores do tipo *NOD* (NLR) ou receptores de interleucina-1 (IL-1R), resultando na sua ativação e aumento do seu potencial de eliminar patógenos (Mosser e Edwards, 2008).

Após a internalização de *Brucella* em fagócitos, a bactéria é localizada em vacúolos delimitados por membrana e pode ser destruída no fagolisossomo ou sobreviver nesse compartimento e multiplicar-se nos sítios intracelulares. A opsonização no momento da internalização torna esta bactéria mais susceptível a ação bactericida dos macrófagos. Na maioria das vezes, as bactérias internalizadas são destruídas no interior de fagolisossomos antes de atingir os sítios de multiplicação intracelulares. No entanto, amostras virulentas de *Brucella* spp. modificam os mecanismos de maturação dos fagolisossomos, impedindo sua fusão com os lisossomos e evitando assim a degradação bacteriana dentro do fagócito (Gorvel e Moreno, 2002). Estas bactérias alteram o tráfego intracelular e a maturação do fagolisossomo, prevenindo a aquisição de marcadores lisossomais e indo em direção ao compartimento com marcadores de retículo endoplasmático rugoso, onde encontra ambiente plenamente favorável à sua multiplicação intracelular (Celli et al., 2003).

Mecanismos microbicidas desenvolvidos pelos fagócitos para eliminação de patógenos são descritos na literatura (Serafino et al., 2007) e, um dos principais, envolve duas enzimas importantes: NADPH oxidase e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). A explosão oxidativa ativa a hexose monofosfato, levando à ativação dos sistemas bactericidas dependentes de oxigênio. Assim, são formadas espécies reativas de oxigênio (ROS) como o anion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH⁻ e [•]OH). Além desses, a explosão oxidativa ativa outros sistemas

como o óxido nítrico (NO) e a mieloperoxidase (MPO). O NO deriva da L-arginina em uma reação catalisada pela óxido nítrico sintetase (NOS), que pode se apresentar na forma induzível (iNOS), endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS). O sistema NO interage com radicais intermediários de O₂ que são produzidos durante a explosão oxidativa originando os radicais intermediários de nitrogênio (RNI). Esses radicais têm grande capacidade oxidante, inativando assim os sistemas enzimáticos das bactérias fagocitadas, levando-as à 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 (López-Urrutia et al., 2000). Entretanto, a importância desses radicais no controle da infecção por *Brucella* ainda carece de esclarecimento.

As principais citocinas produzidas pelos macrófagos durante a infecção por *Brucella* sp. são a IL-12 e o TNF- α (Zhan et al., 1996; Rolán e Tsolis, 2008; Macedo et al., 2013). A IL-12 modula a resposta imune adaptativa por estímulo direto da atividade citotóxica em linfócitos T CD8⁺, além promoverem a diferenciação dos linfócitos T auxiliares em linfócitos T CD4⁺ subtipo 1 (Th1). Por outro lado, acredita-se que o papel do TNF- α esteja relacionado com a ativação de células efetoras da resposta pró-inflamatória, importantes no controle inicial da multiplicação bacteriana (Zhan et al., 1996). Estudo com camundongos demonstram que a produção de IL-10 por célula T CD25⁺ CD4⁺ modula a função de macrófagos e contribui para um balanço inicial entre citocinas pró e anti-inflamatórias benéfico para *B. abortus*, proporcionando a sobrevivência desse patógeno e persistência da infecção (Xavier et al., 2013). A produção de IL-10 por macrófagos está associada ao aumento da persistência de bactérias como *Mycobacterium leprae* (Sieling e Modlin, 1994), *Mycobacterium tuberculosis* (O'leary et al., 2011) e *Coxiella burnetti* (Ghigo et al., 2001), devido à sua habilidade de modular a resposta Th1 necessária para o controle de patógenos intracelulares.

Em bovinos, alguns trabalhos suportam a idéia de que uma menor susceptibilidade à *B. abortus* está associada à habilidade do macrófago em controlar a multiplicação intracelular do patógeno (Campbell et al., 1994; 1996; Rossetti et al., 2010) e que essa habilidade pode estar relacionada à raça. Como exemplo, macrófagos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) são mais eficientes em controlar a multiplicação intracelular de *B. abortus* quando comparados aos macrófagos de bovinos da raça holandesa (*Bos taurus taurus*), além de demonstrarem ter maior transcrição de citocinas pró-inflamatórias e maior produção de óxido nítrico durante a infecção por *B. abortus* (Macedo et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPAS BACTERIANAS, MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa de referência (WT) de *B. ovis* ATCC 25840, a cepa mutante isogênica $\Delta abcBA$ com deleção de um transportador ABC (Silva et al, 2011) e a cepa mutante $\Delta virB2$ com o SST4 afuncional de *B. ovis* (Sá et al., 2012) foram utilizadas neste estudo. WT *B. ovis*,

$\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ expressando uma proteína fluorescente *mCherry* (nomeadas *mCherry-WT B. ovis*, *mCherry- $\Delta abcBA$* e *mCherry- $\Delta virB2$* , respectivamente) foram utilizados neste estudo (Tabela 1). Estas cepas foram construídas pela inserção do plasmídeo pKSoriT-*bla-kan-PsojA-mCherry*, de acordo com Copin et al. (2012), adjacente ao promotor constitutivo do gene *secE* no cromossomo I da *B. ovis*. Os inóculos foram cultivados em ágar triptona de soja (TSA) (Invitrogen, EUA) com 1% de hemoglobina (Becton-Dickinson, EUA) a 37°C em 5% de CO₂ durante três dias. Canamicina (Kan, 100 µg/mL) e ampicilina (Amp, 200 µg/mL) foram adicionadas ao meio quando necessário. Para as cepas *mCherry-WT B. ovis*, *mCherry- $\Delta abcBA$* , e *mCherry- $\Delta virB2$* , colônias foram selecionadas para resistência a Amp e fluorescência, como descrito anteriormente (Copin et al., 2012). As suspensões bacterianas foram ajustadas a uma concentração final pelo espectrofotômetro usando comprimento de onda 600 nm (OD₆₀₀), diluídas seriadamente (1:10) em solução tampão fosfato-salina (PBS), semeadas em placas de TSA com 1% de hemoglobina incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante três dias e, em seguida, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi calculada para confirmar inóculo.

4.2 ISOLAMENTO, CULTIVO E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS OVINOS DERIVADOS DE MONÓCITOS

Culturas de macrófagos primários foram obtidas por diferenciação de monócitos do sangue periférico, adaptado do protocolo previamente descrito por Campbell e Adams (1992). Resumidamente, 60 mL de sangue de carneiros adultos foram coletados com uma seringa contendo ácido-citrato-dextrose (ACD) por punção da veia jugular. Carneiros foram considerados livres de *B. ovis* baseado em resultado obtido por imunodifusão em gel de agar (IDGA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de amostras de urina.

Tabela 1. Cepas bacterianas e plasmídeos usados neste estudo.

Cepas/Plasmídeos	Descrição	Referência
Cepas		
WT <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i> ATCC25840	ATCC
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$	<i>B. ovis</i> $\Delta BOV2_A500-501::Kan^R$	Silva et al. (2011)
<i>B. ovis</i> $\Delta virB2$	<i>B. ovis</i> $\Delta virB2::pAV2.2::Kan^R$	Sá et al. (2012)
WT <i>B. ovis-mCherry</i>	<i>B. ovis::pKSoriT+mCherry-Kan^R, Amp^R</i>	Silva et al. (2014)
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ - <i>mCherry</i>	<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA::pKSoriT+mCherry-KanR, AmpR$	Silva et al. (2014)
<i>B. ovis</i> $\Delta virB2$ - <i>mCherry</i>	<i>B. ovis</i> $\Delta virB2::pKSoriT+mCherry-KanR, AmpR$	Silva et al. (2014)
Plasmídeos		
pKSoriT+mCherry	pKSoriT- <i>bla-kan-carb-PsojA-mCherry</i>	Copin et al. (2012)

R: resistência

Inicialmente, o sangue foi diluído (1:2) em PBS (pH 7,4), foi lentamente depositado sobre uma coluna de solução de Histopaque (Sigma-Aldrich, EUA), e depois centrifugado a 1000 x g durante 40 min a 18°C.

Após a separação, a interfase contendo as células mononucleares foi recolhida, lavadas três vezes em PBS e re-suspendidas em 15 mL de meio RPMI (Invitrogen, EUA) suplementado com 4 mM de L-glutamina (Invitrogen, EUA), 1 mM de aminoácidos não-essenciais (Invitrogen, EUA), piruvato de sódio 1 mM (Invitrogen, EUA), 2,9 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, EUA), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células em suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de Teflon de 125 mL (Nalgene Company, EUA), e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 24 h. As células não aderentes foram removidas, foi adicionado 15 mL de RPMI suplementado com 10% de SFB sem antibióticos, e as células foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 11 dias, trocando o meio a cada três dias. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA, Protocolo 62/2014).

Após 11 dias em cultura, macrófagos foram removidos dos frascos por resfriamento em gelo durante 20-30 minutos, seguido por agitação vigorosa. A suspensão de células foi transferida para tubos de polipropileno estéreis e centrifugados a 1000 x g durante 10 min a 4°C. As células foram re-suspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, e o número de células viáveis foi determinado com base na exclusão de azul de tripan, com auxílio de uma câmara de hemocítmetro. Os macrófagos foram adicionados a placas de 96 poços a uma concentração de 5×10^5 /mL em RPMI suplementado com 10% de SFB, incubados *overnight* a 37°C em 5% de CO₂ para promover a adesão celular e, em seguida, inoculados com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ a uma concentração de 5×10^7 bactérias/mL, com a multiplicidade de infecção (MOI) de 1:100. A placa foi centrifugada a 400 x g durante 5 min à temperatura ambiente e incubadas durante 30 min a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cada poço foi substituído com meio RPMI suplementado com 10% de SFB e gentamicina (Invitrogen, EUA) a uma concentração final de 100 µg/mL e incubadas durante 1 h a 37°C em 5% de CO₂ para a inativação de bactérias extracelulares. Além disso, a suspensão bacteriana foi incubada em separado com meio RPMI contendo gentamicina e semeadas em placas de TSA com 1% de hemoglobina, para confirmar a atividade da gentamicina. Para avaliar o tempo de internalização (denominado tempo zero), os macrófagos foram lavados uma vez com PBS, lisados com água destilada estéril, diluídos em série em PBS e plaqueados em placas de TSA com 1% de hemoglobina isenta de antibiótico (WT) ou contendo canamicina 100 µg/mL (mutante) para contagens de UFC. Para avaliar a cinética de sobrevivência intracelular, os macrófagos foram infectados e lisados nas mesmas condições em 8, 24, e 48 h após a infecção (hpi). Todos esses experimentos foram repetidos, pelo menos três vezes, incluindo as cepas *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry*- $\Delta abcBA$ e *mCherry*- $\Delta virB2$.

4.3 IMUNOCITOQUÍMICA

Macrófagos ovinos foram adicionados *overnight* a *chamber slides* (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System, Thermo Scientific, EUA) a 37°C em 5% de CO₂ para promover a adesão celular e foram infectados com WT de *B. ovis*, $\Delta abcAB$ ou $\Delta virB2$ de *B. ovis* com MOI de 1:100, nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Nos tempos 8, 24 e 48 horas as amostras foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 20 min a temperatura ambiente e processadas para imunocitoquímica. Resumidamente, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e, então, incubadas por 30 min com anticorpo primário, utilizando soro policlonal diluído (1:5000) de coelho experimentalmente infectados duas vezes (com um mês de intervalo) com 1×10^9 UFC de *B. ovis* (ATCC 25840) (Silva et al., 2011). Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com anticorpo secundário biotilado (LSAB+ Kit, DAKO Corporation, EUA) por 20 minutos, seguida de mais uma lavagem em PBS e incubação por 20 minutos com complexo de estreptoavidina-peroxidase (LSAB+ Kit, DAKO Corporation, EUA). A reação foi revelada usando 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, DAKO Corporation, EUA) por 10 min e contracorados com hematoxilina de Mayer. As células foram avaliadas quanto à imunodeteção de bactéria intracelular.

4.4 MICROSCOPIA CONFOCAL

Macrófagos foram adicionados a lamínulas de vidro de 13 mm acondicionadas em uma placa de 24 poços a uma concentração de 6×10^5 células/mL e incubadas *overnight* a 37°C em CO₂ a 5% para promover a adesão celular. Para os estudos de co-localização, devido à falta de anticorpos com reação cruzada para *Ovis aries* comercialmente disponíveis, os macrófagos foram transitoriamente transduzidos utilizando um kit comercial CellLight Lisossomo-GFP Beckman 2.0 (Invitrogen, EUA) para a marcação da proteína lisossomal LAMP-1 ou CellLight ER-GFP Beckman 2.0 (Invitrogen, EUA) para a marcação da calreticulina (um marcador de retículo endoplasmático), ajustada a proporção de 30 partículas virais por célula e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 16 h, de acordo com as instruções do fabricante. Os macrófagos foram, então, infectados com *mCherry-WT B. ovis*, *mCherry- $\Delta abcBA$* e *mCherry- $\Delta virB2$* com MOI de 1:100, nas mesmas condições anteriormente mencionadas, sob proteção da luz. Após 8, 24, e 48 h, cada poço contendo uma lamínula foi lavado três vezes com PBS, fixados com paraformaldeído a 4% em PBS durante 20 min à temperatura ambiente, sob proteção da luz. A lamínula foi removida de cada poço e montada em lâminas de vidro utilizando o meio de montagem para a fluorescência Fluoshield (Sigma-Aldrich, EUA) contendo 4'-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), um marcador de ácido nucléico, e incubadas durante 5 min à temperatura ambiente e protegido da luz. As amostras foram analisadas em um microscópio confocal modelo LSM 510 Meta (Carl Zeiss, EUA) equipado com uma objetiva de imersão de 63 x (Plan-Apochromat 63x/1.4). Imagens confocais de 1024x1024 pixels foram adquiridas e reunidas usando o Adobe Photoshop CS5. Para quantificar a infecção por *B. ovis* nas células e co-localização de compartimentos positivos para LAMP-1 ou calreticulina, pelo menos 100 células por amostra foram analisados.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Macrófagos foram adicionados a *chamber slide* em uma concentração de 10^6 macrófagos/poço e infectados com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA \Delta virB2$ na concentração de 10^8 bactérias/poço (MOI 1:100), como descrito anteriormente. Depois de 30 min, 24 e 48 hpi, os macrófagos foram fixados com glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante 24 h e mantidos em tampão de cacodilato de 0,1 M (pH 7,2) até o processamento para MET. Macrófagos não infectados foram incluídos como controle em cada tempo. As amostras foram processadas pela técnica de *flat embedding* descrito por Steiner et al (1994). Secções ultrafinas foram feitas em um ultramicrotomo (Leica EM UC6, Áustria), contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo 5%, e examinado em um microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12-12 kV - FEI SpiritBiotwin, EUA).

4.6 MENSURAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Quantificação de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) foi baseada na quantificação fluorimétrica utilizando a sonda fluorescente permeável 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA) (Sigma Aldrich, EUA) e CellRox Deep Red Reagent (Invitrogen, EUA), respectivamente. Resumidamente, os macrófagos foram adicionados a placas de 96 poços (7×10^4 macrófagos/poço) e infectados com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$, ou $\Delta virB2$, e incubados durante 8, 24, e 48 h, sob as mesmas condições que as descritas anteriormente. LPS de *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, EUA) a uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada para estimular os macrófagos como controle positivo. O controle negativo consistiu em macrófagos não infectados. As sondas DAF-2 DA, a uma concentração final de 2,5 μM em PBS e CellRox na concentração final de 5 μM em PBS foram adicionadas em cada poço em cada tempo, incluindo os controles, e a placa incubada a 37°C em 5% CO_2 durante 1 h. Após este tempo, as células foram fixadas com 200 μL de paraformaldeído a 4% em PBS durante 20 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, as células foram re-suspendidas por resfriamento da placa no gelo durante 30 min, transferidas para tubos de citometria de fluxo e lidas no citômetro FACScalibur (Becton Dickinson, EUA), utilizando comprimentos de onda de 488 nm/515 nm (excitação e emissão, respectivamente) para DAF-2 DA e 644 nm/665 nm (excitação e emissão, respectivamente) para CellRox Deep Red.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados de UFC sofreram transformação logarítmica e foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para microscopia confocal, todos os dados percentuais foram submetidos à transformação angular antes da ANOVA. Médias de grupos foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls (SNK), usando o programa de análise estatística Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA), e considerado significativo quando $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média e o erro padrão de três experimentos independentes.

5. RESULTADOS

5.1 INTERNALIZAÇÃO E CINÉTICA DE SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE WT *BRUCELLA OVIS*, $\Delta ABCBA$ E $\Delta VIRB2$ EM MACRÓFAGOS OVINOS

Macrófagos ovinos derivados de monócitos do sangue periférico foram infectados com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$, ou $\Delta virB2$ e bactérias intracelulares foram contadas às 0, 8, 24 e 48 hpi (Figura 1). O perfil de internalização de WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ foram semelhantes (tempo 0 de infecção), e o número de UFC diminuiu igualmente entre as cepas em 24 hpi. No entanto, os níveis de infecção de $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ foram significativamente menores em 48 hpi ($p < 0,001$), quando comparados com WT *B. ovis*, confirmando que essas cepas mutantes não são capazes de multiplicarem intracelularmente em macrófagos. Em contraste, a cepa WT *B. ovis* foi capaz de sobreviver e multiplicar dentro de macrófagos ovinos, com um aumento no número de UFC intracelular em 48 hpi (~ 2 logs) em comparação com as cepas mutantes. Avaliação imunocitoquímica de macrófagos após infecção demonstrou localização intracelular de bactérias ao longo do curso da infecção (Figura 2). Análise ultra-estrutural de macrófagos ovinos após a infecção com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$, ou $\Delta virB2$ foi realizada em diferentes tempos após a infecção. Como mostrado na Figura 3A, aos 30 min após a infecção, foi possível visualizar as bactérias dentro de um vacúolo delimitado por uma membrana em macrófagos infectados com a cepa WT *B. ovis*. Não foram observadas características morfológicas de morte celular. Em contraste, bactérias degradadas já eram possíveis de serem observadas dentro de vacúolos de macrófagos infectados com as cepas mutantes $\Delta abcBA$ (Figura 3B) ou $\Delta virB2$ (Figura 3C) em 30 min após a infecção. Ao fim de 24 hpi, a maior parte do VCB (WT e mutantes) eram morfológicamente compatível com fagolisossomos contendo alguns restos celulares (Figuras 3D e 3E). Estruturas eletrodensas compatíveis com figuras de mielina (sugestivas de processo degenerativo) foram observadas no citoplasma de macrófagos infectados em 24 hpi, tornando-se mais abundantes em 48 hpi (Figura 3F). Tais estruturas não foram observadas em macrófagos não infectados.

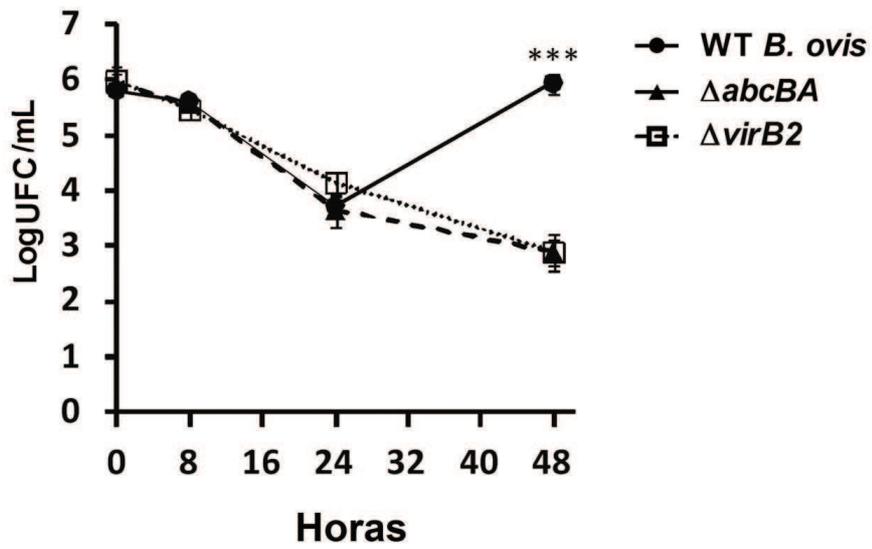


Figura 1. Internalização e sobrevivência intracelular de WT *Brucella ovis*, $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos. Os dados representam a média e erro padrão (n = 6) de três experimentos independentes. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre a WT e mutantes (***) p<0,001).

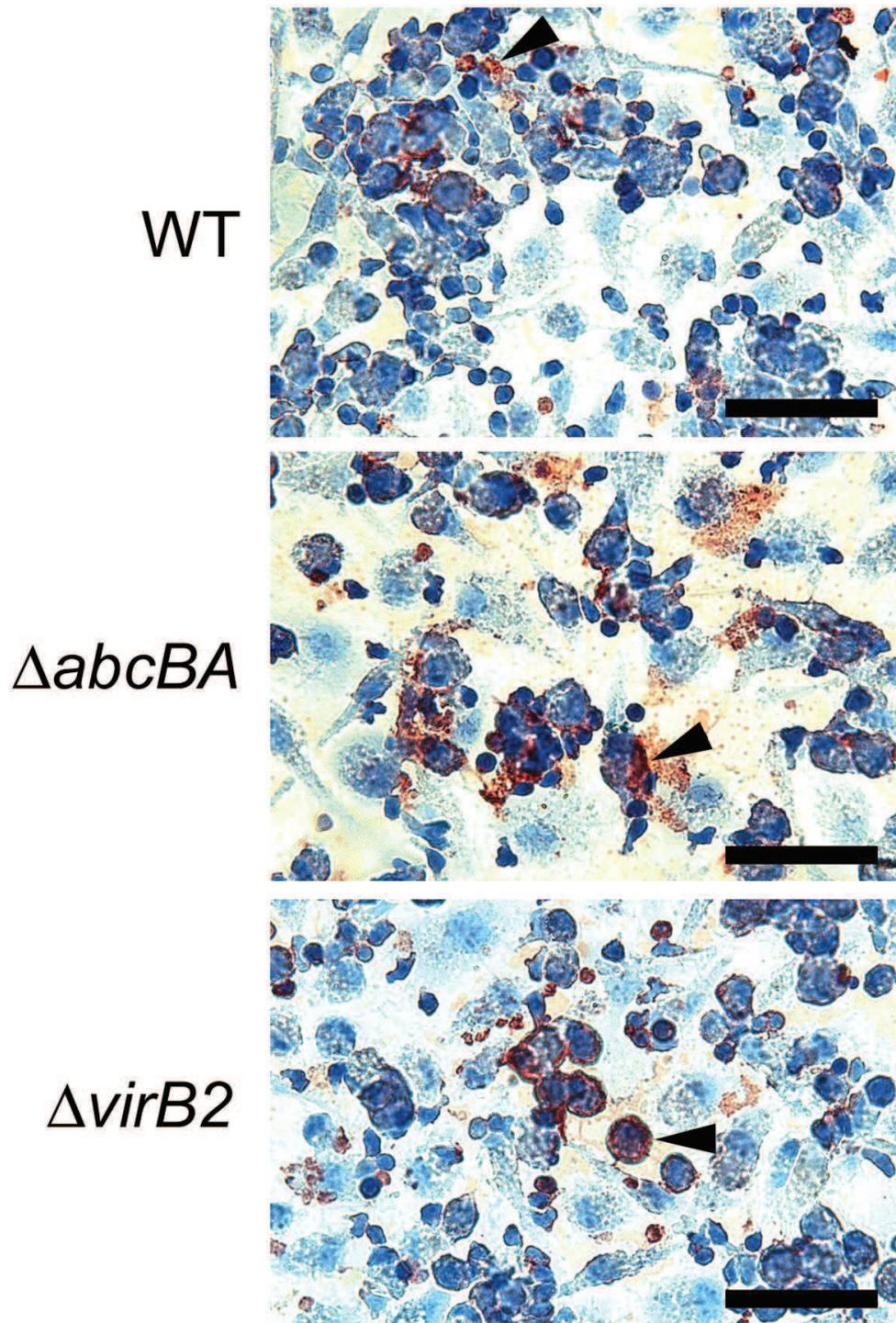


Figura 2. Imagem representativa da imunomarcção intracitoplasmática de WT *Brucella ovis*, $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos. Os macrófagos foram infectados em uma *chamber slide* e, em seguida, imunomarcados às 8, 24 e 48 h após a infecção. Imunomarcção de WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$, e $\Delta virB2$ (coloração vermelha indicado pelas pontas de seta) se localiza no citoplasma de macrófagos ovinos contrastadas com hematoxilina de Mayer. As micrografias são representativas do tempo 8 hpi. Barra = 50 μm .

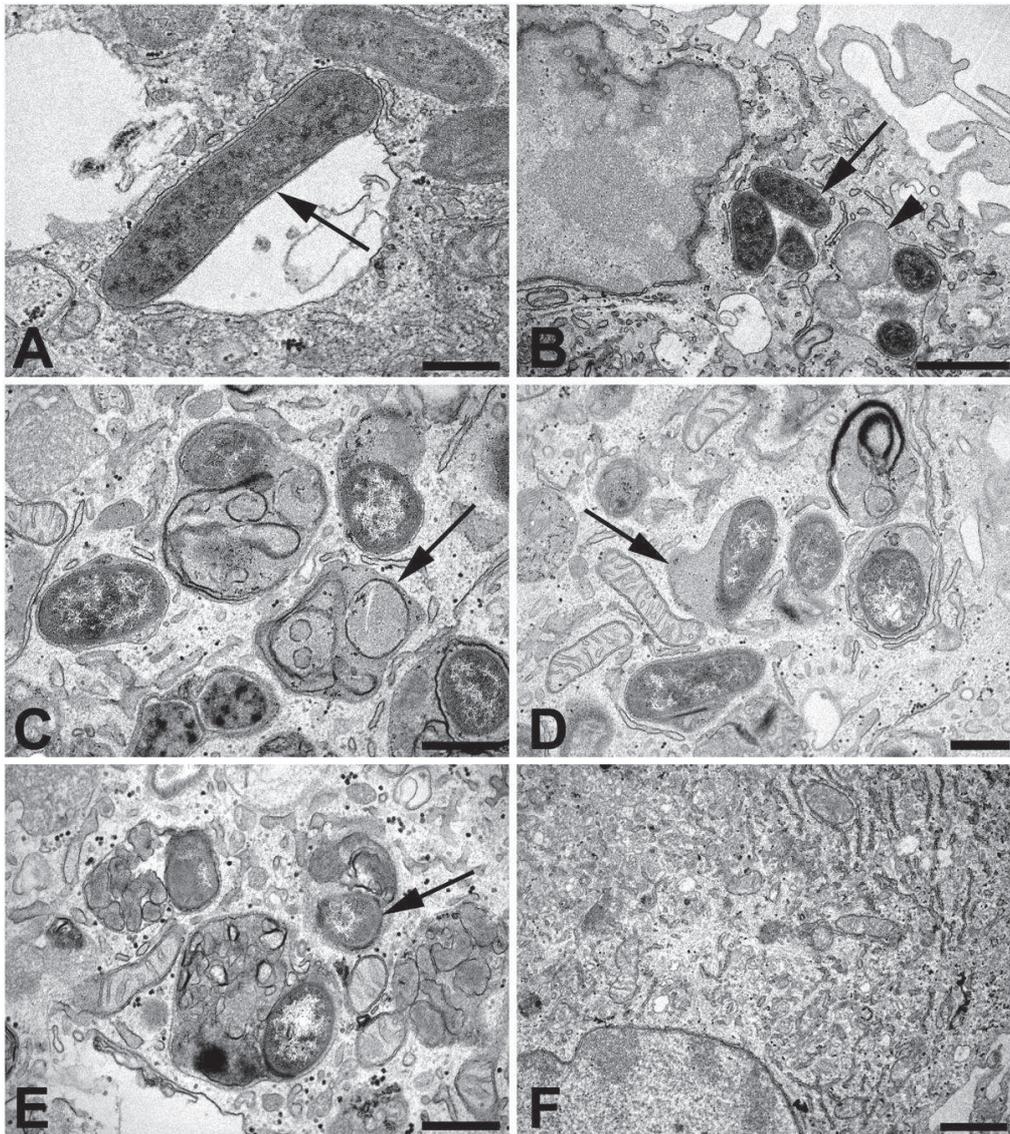


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos ovinos infectados com as cepas WT, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ de *Brucella ovis*. Os macrófagos foram infectados durante 30 min., 24 e 48 h em uma *chamber slide*, fixados com glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato e processados para microscopia eletrônica de transmissão. (A) Vacúolo citoplasmático contendo uma bactéria (seta) em macrófagos infectados com WT *B. ovis* 30 min pós-infecção; bar = 500 nm. (B) Vacúolos contendo várias bactérias (seta) e bactérias degradadas (cabeça de seta) em um macrófago infectado com cepa mutante $\Delta abcBA$ de *B. ovis* 30 min pós-infecção; barra = 1 μ m. (C) Figuras de mielina em um macrófago infectado com a cepa mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* 30 min após a infecção; bar = 500 nm. (D) Vacúolo contendo bactérias fundido com lisossomo, caracterizado por um teor ligeiramente eletrondenso dentro do vacúolo (seta), em um de macrófago infectado com $\Delta virB2$ de *B. ovis* 30 min pós-infecção; bar = 500nm. (E) Bactérias degeneradas associadas as figuras de mielina (seta) em um macrófago infectado com a cepa mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* 24 hpi; bar = 500 nm. (F) Macrófagos infectados com a cepa mutante $\Delta abcBA$ de *B. ovis* 48 hpi sem quaisquer bactérias intracelulares; barra = 1 μ m.

5.2 TRÁFEGO INTRACELULAR DE *MCHERRY*-WT *BRUCELLA OVIS*, *MCHERRY-ΔABCBA* E *MCHERRY-ΔVIRB2* EM MACRÓFAGOS OVINOS

Estudos têm demonstrado a importância do transportador ABC codificado pelos genes *abcEDCBA*, assim como do SST4 para a sobrevivência intracelular da *B. ovis* (Silva et al., 2011; Sá et al., 2012; Silva et al., 2014). No entanto, o papel destes fatores de virulência na sobrevivência intracelular de *B. ovis* em macrófagos do hospedeiro preferencial de infecção não foi estudado. Para assegurar que a inserção do gene *mCherry* não interferiu com o crescimento *in vitro* e a sobrevivência intracelular das cepas de *B. ovis*, uma curva de crescimento *in vitro* e a infecção de macrófagos foram realizadas. Como esperado, as cepas *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry-ΔabcBA* e *mCherry-ΔvirB2* cresceram em meio de TSA com 1% de hemoglobina de forma semelhante quando comparada com a cepa parental de *B. ovis*. As cepas *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry-ΔabcBA*, *mCherry-ΔvirB2* e WT *B. ovis* estavam na fase exponencial de crescimento entre 24 e 72 h de incubação a 37°C com 5 % de CO₂ e, em seguida, entraram na fase estacionária de crescimento (Figura 4). Além disso, *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry-ΔabcBA*, e *mCherry-ΔvirB2* apresentaram internalização e cinética de infecção em macrófagos ovinos muito semelhantes ao das cepas sem inserção do gene *mCherry* (Figura 5). Devido à falta de anticorpos com reação cruzada para *Ovis aries* comercialmente disponíveis, utilizou-se o kit comercial CellLight Lysosome-GFP Beckman 2.0 (marcador LAMP-1) e CellLight calreticulin-GFP Beckman 2.0 (marcador retículo endoplasmático), ambos baseados na transdução viral, o que nos permitiu avaliar adequadamente o tráfego intracelular de *B. ovis* em macrófagos durante o curso da infecção. Como mostrado na Figura 6A e 6B, LAMP-1 foi rapidamente adquirida por VCB e a maioria das bactérias (~ 80%) colocalizaram com compartimentos LAMP-1⁺ em 8 hpi. No entanto, em 24 hpi (p<0,01) e 48 hpi (p<0,001), a maioria dos VCB de macrófagos infectados com *mCherry-ΔabcBA* e *mCherry-ΔvirB2* foram LAMP-1⁺, em contraste com VCB de macrófagos infectados com *mCherry*-WT *B. ovis*, que tiveram uma baixa percentagem de colocalização. Aos 48 hpi, uma grande quantidade de *mCherry*-WT *B. ovis* foi observada no citoplasma de macrófagos, quando comparadas com as cepas mutantes *mCherry-ΔabcBA* e *mCherry-ΔvirB2* (p<0,001) (Figura 6C). Para excluir a possibilidade de que a transdução viral poderia afetar a cinética da infecção intracelular das cepas utilizadas neste estudo, os experimentos de sobrevivência intracelular foram repetidas após a transdução (Figura 6D). Como esperado, o número de UFC recuperado ao longo do tempo foi muito semelhante ao que é mostrado na Figura 1.

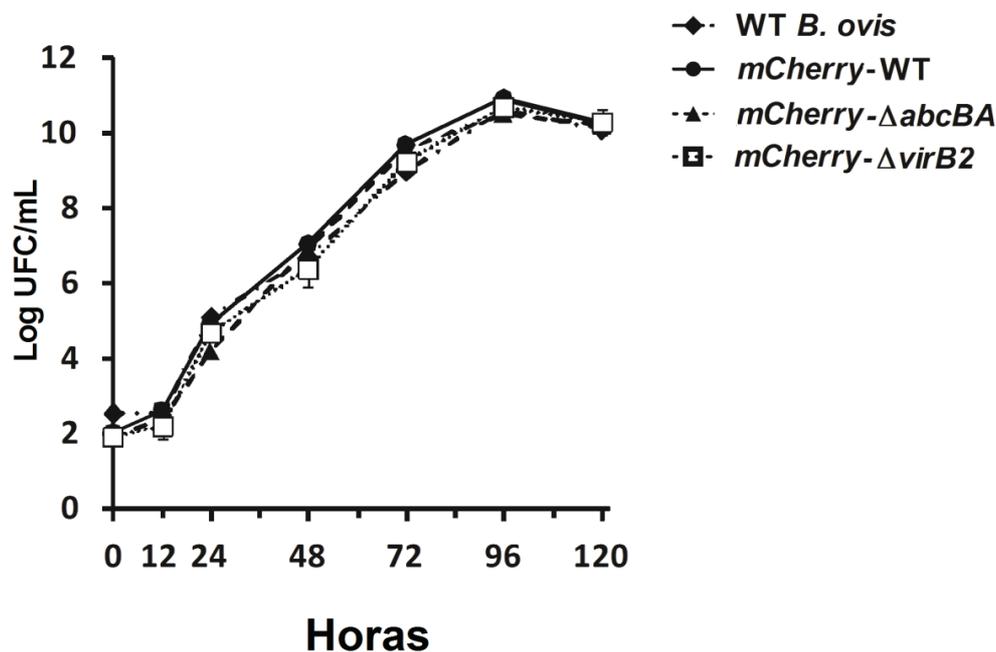


Figura 4. Curva de crescimento *in vitro* das cepas WT, *mCherry*-WT, *mCherry*- $\Delta abcBA$, e *mCherry*- $\Delta virB2$ de *Brucella ovis*. As cepas foram cultivadas em placas de TSA com 1% de hemoglobina a 37°C em 5% de CO₂. Dados representam a média e o erro padrão de três experimentos independentes.

Além disso, experimentos semelhantes de microscopia confocal com marcação para calreticulina, um marcador de RE, foram realizados. Às 8 hpi, um baixo percentual (~ 20%) de todas as bactérias (WT) e mutantes co-localizaram com compartimentos calreticulina⁺ (Figura 7A e 7B). No entanto, em 24 e 48 hpi, VCB de macrófagos infectados com *mCherry*-WT *B. ovis* mostraram um recrutamento progressivo e extenso do marcador calreticulina, que pode ser visto pela elevada percentagem de co-localização, o que corresponde a aproximadamente 60% e 90% de VCB às 24 e 48 hpi, respectivamente. Em contraste, VCB de macrófagos infectados com as cepas mutantes *mCherry*- $\Delta abcBA$ ou *mCherry*- $\Delta virB2$ tinham uma percentagem muito baixa de co-localização com calreticulina ao longo do curso da infecção, que coincidiu com o baixo percentual de macrófagos contendo bactérias intracelulares (~ 5%; $p < 0,001$) (Figura 7C). Da mesma forma, a transdução viral não afetou a cinética de bactérias intracelulares (Figura 7D). Estes resultados demonstram que *B. ovis* sem o transportador ABC espécie-específico ou um SST4 funcional não são capazes de controlar e dirigir a maturação do seu vacúolo num nicho de multiplicação, isto é, um vacúolo semelhante ao retículo endoplasmático, portanto não são capazes de sobreviverem intracelularmente.

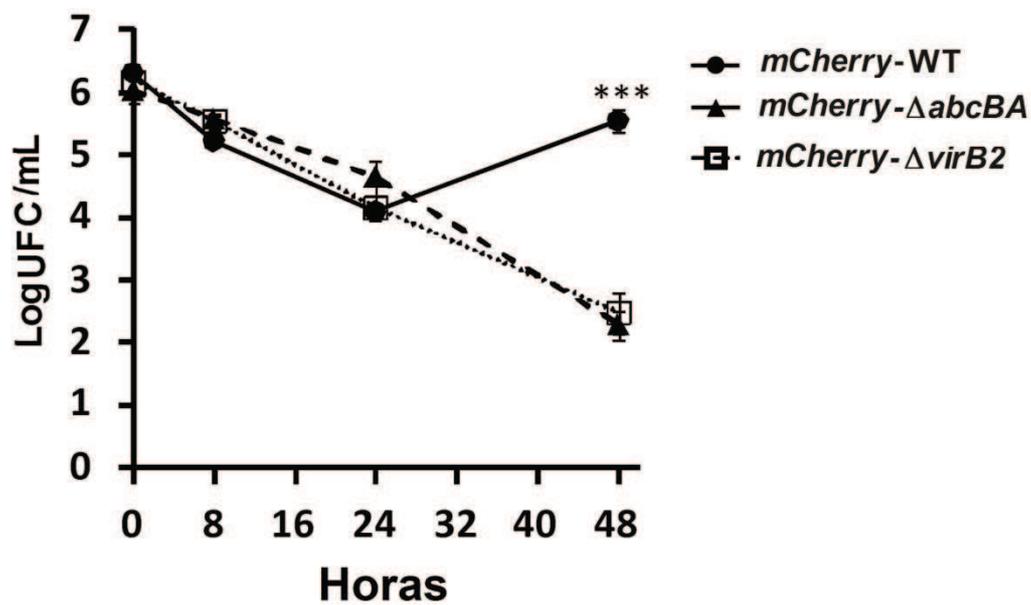


Figura 5. Cinética de infecção em macrófagos ovinos das cepas *mCherry*-WT *Brucella ovis*, *mCherry*- $\Delta abcBA$, e *mCherry*- $\Delta virB2$ de *Brucella ovis*. Os dados representam a média e o erro padrão (n = 6) de três experimentos independentes. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre a WT e mutantes (***) $p < 0,001$.

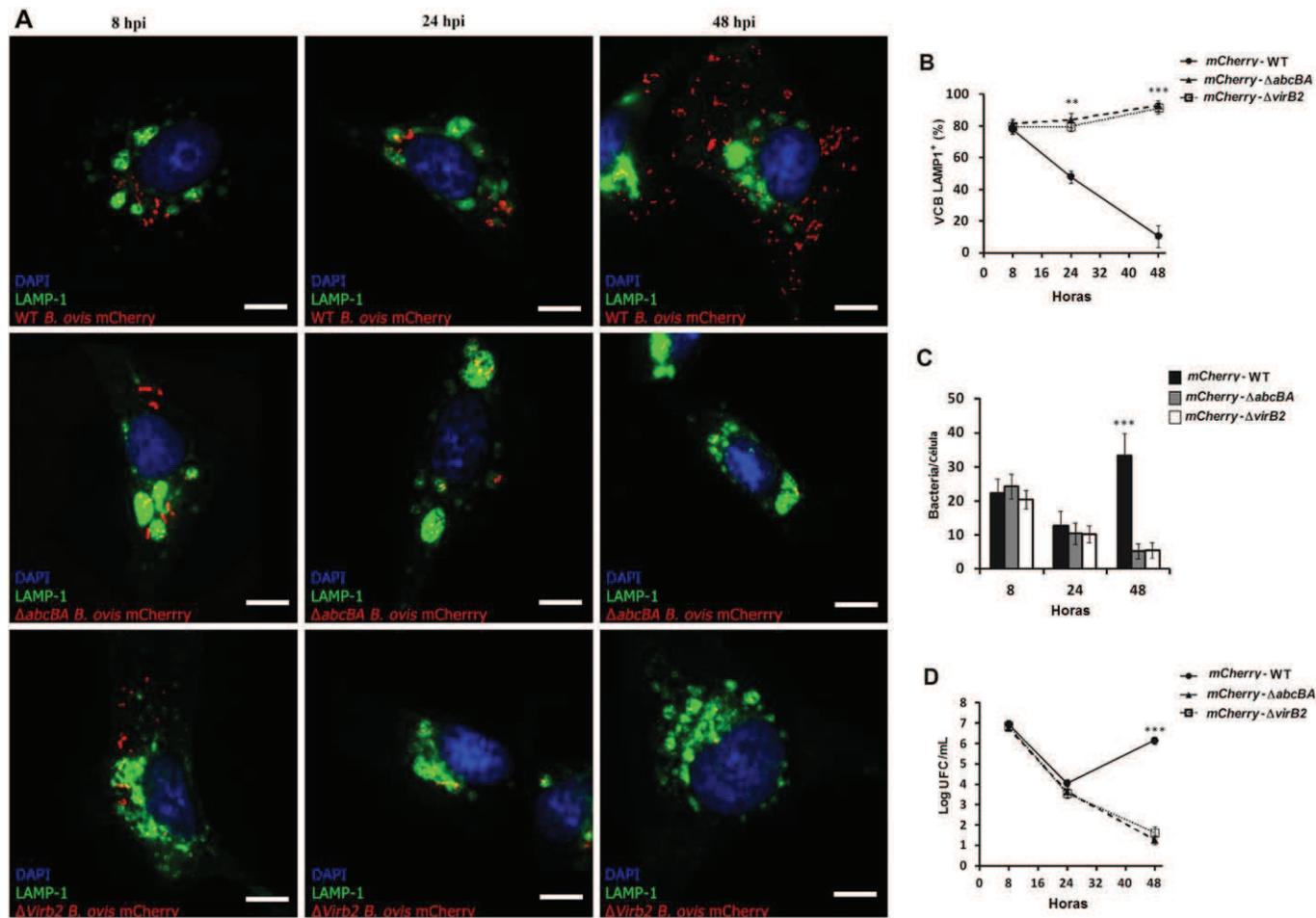


Figura 6. Tráfego intracelular de WT *Brucella ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos expressando LAMP-1. (A) Imagens representativas de microscopia confocal de macrófagos ovinos expressando LAMP-1 e infectados com as cepas *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry*- $\Delta abcBA$ ou *mCherry*- $\Delta virB2$ de *B. ovis*. (B) Percentual médio de vacúolos contendo *Brucella* (VCB) que foram positivas para LAMP-1 durante a infecção. (C) Número médio de bactérias por célula (total de 100 células por tempo) ao longo da infecção. (D) cinética de infecção *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry*- $\Delta abcBA$, e *mCherry*- $\Delta virB2$ de *B. ovis* em macrófagos ovinos que expressam LAMP-1 por transdução transitória (ver seção Material e métodos). Os dados representam a média e o erro padrão de pelo menos 100 células a partir de três experimentos independentes (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

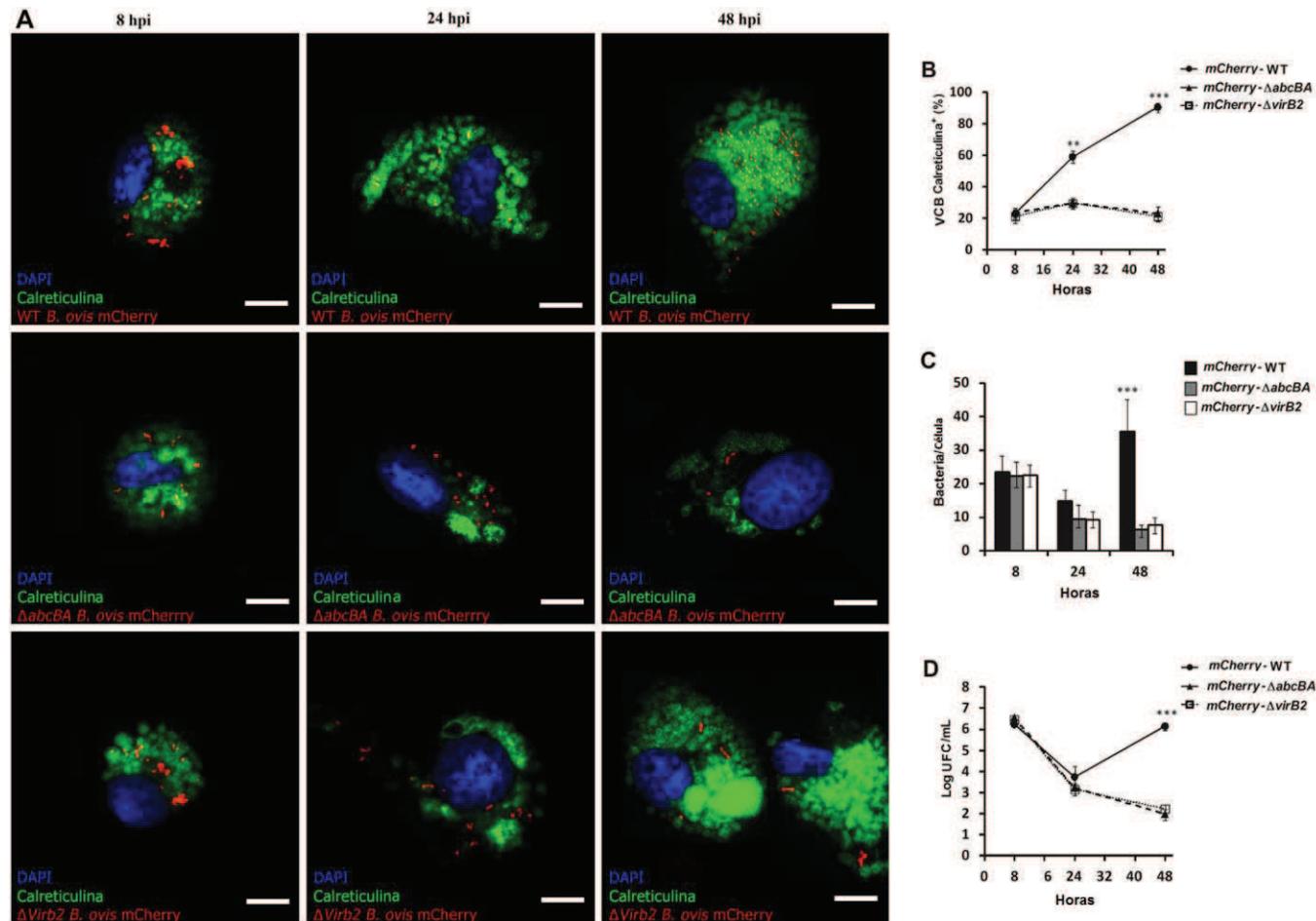


Figura 7. Tráfego intracelular de WT *Brucella ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ em macrófagos ovinos expressando calreticulina. (A) Imagens representativas de microscopia confocal de macrófagos ovinos expressando calreticulina e infectados cepas *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry*- $\Delta abcBA$ ou *mCherry*- $\Delta virB2$ de *B. ovis*. (B) Percentual médio de VCB que foram positivas para calreticulina durante a infecção. (C) Número médio de bactérias por célula (total de 100 células por tempo) ao longo da infecção. (D) cinética de infecção *mCherry*-WT *B. ovis*, *mCherry*- $\Delta abcBA$, e *mCherry*- $\Delta virB2$ de *B. ovis* em macrófagos ovinos expressam calreticulina por transdução transitória (ver seção Material e métodos). Os dados representam a média e o erro padrão de pelo menos 100 células a partir de três experimentos independentes (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MACRÓFAGOS OVINOS INFECTADOS COM AS CEPAS WT *BRUCELLA OVIS*, $\Delta ABCBA$ OU $\Delta VIRB2$

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ovinos durante o curso da infecção com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ foi avaliada (Figura 8). Como esperado, LPS de *E. coli* induziu elevados níveis de NO em 8, 24, e 48 hpi. NO também foi detectável após a infecção com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ em todos os tempos avaliados, embora em níveis mais baixos quando comparado com o LPS. Curiosamente, em 48 hpi, WT *B. ovis* induziram níveis mais elevados de NO quando comparado com as cepas mutantes $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ ($p < 0,05$). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada também ao longo do tempo na infecção por *B. ovis* em macrófagos ovinos. Da mesma forma, LPS de *E. coli* induziu a produção de ROS significativa em todos os tempos avaliados após a infecção (Figura 9).

Níveis mais altos de ROS foram detectados em 8 e 24 hpi em macrófagos infectados com WT *B. ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$, embora tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Além disso, contrariamente ao que foi observado para o NO, as cepas mutantes $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ induziram quantidades significativamente mais elevadas de ROS em comparação com WT *B. ovis* ($p < 0,05$) em 48 hpi (Figura 9).

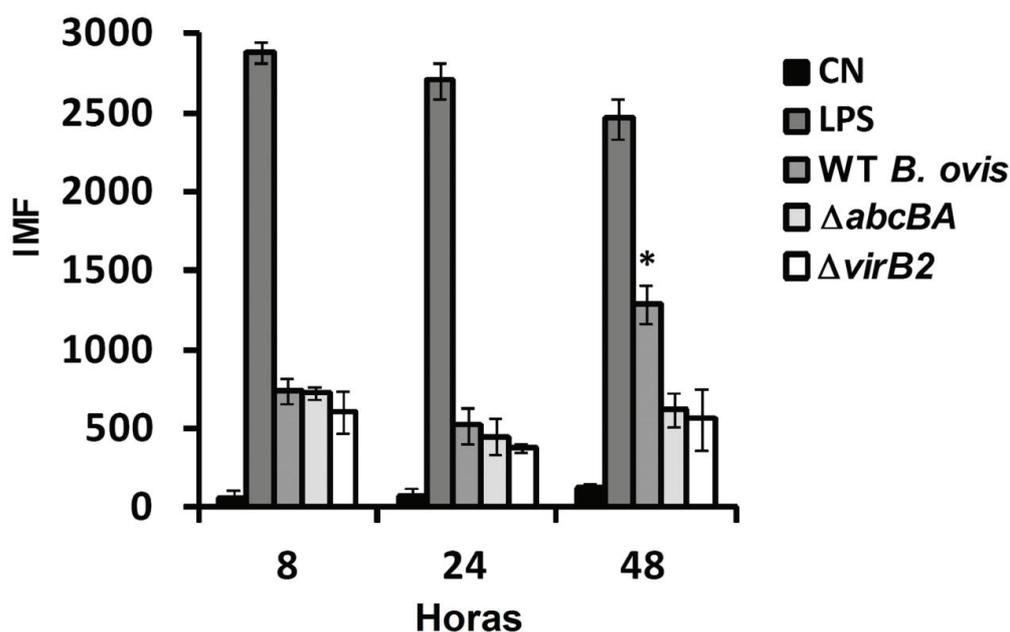


Figura 8. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados com WT *Brucella ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$. Os macrófagos foram marcados com a sonda DAF-2 durante 1 h e analisados por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência média (IMF). LPS de *E. coli* (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi utilizado para estimular os macrófagos como controle positivo. Macrófagos não infectados foram usados como controle negativo (CN). As barras representam a média e erro padrão de três experimentos independentes. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre WT e mutantes (* $p < 0,05$).

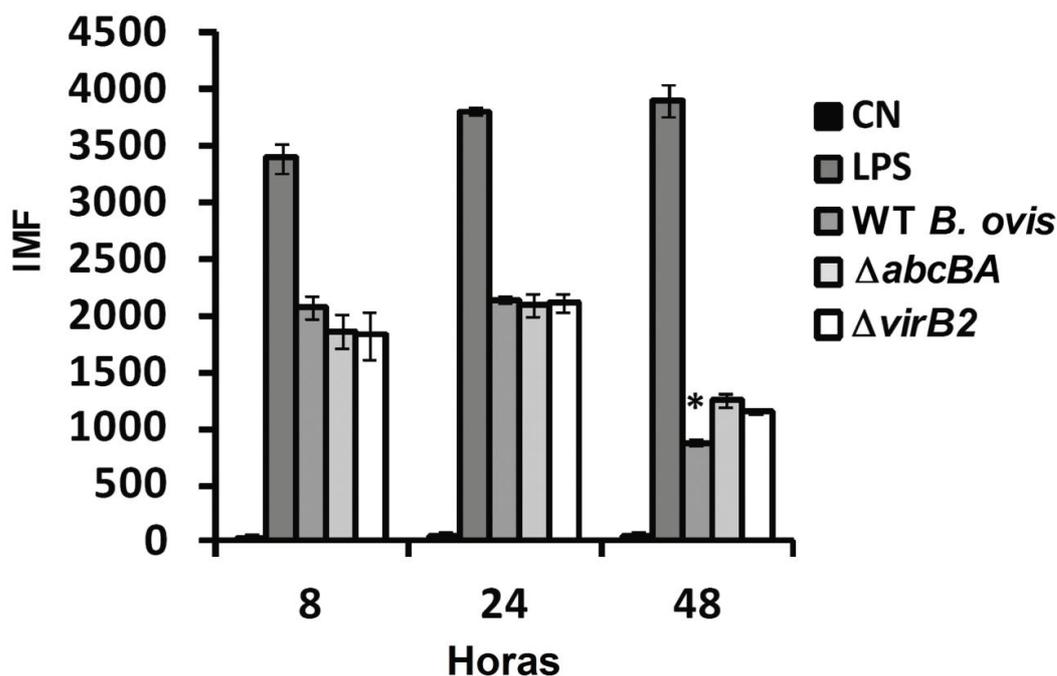


Figura 9. Produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos infectados com as cepas WT *Brucella ovis*, $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$. Os macrófagos foram marcadas com a sonda CellRox Deep Red durante 1 h e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência média (IMF). LPS de *E. coli* (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi utilizado para estimular os macrófagos como controle positivo. Macrófagos não infectados foram usados como controle negativo (CN). As barras representam a média e erro padrão de três experimentos independentes. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre WT e mutantes (* $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que descreve a sobrevivência e tráfego intracelular de *B. ovis* em macrófagos ovinos primários, ou seja, a principal célula fagocítica do sistema imunológico da espécie hospedeira preferencial na infecção por *B. ovis*. Isto é particularmente importante no caso de *B. ovis*, uma vez que é uma das espécies mais restrita de hospedeiro no gênero *Brucella*, o que torna a avaliação da interação com o macrófago ovino primário crucial para validar os dados publicados anteriormente sobre a patogênese de *B. ovis* (Xavier et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que as cepas $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ de *B. ovis* não são capazes de modularem o tráfego intracelular e, conseqüentemente, falham em multiplicar intracelularmente em macrófagos ovinos. Estes resultados estão de acordo com nossos estudos anteriores, que demonstraram que as cepas $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ são atenuadas em linhagens de macrófagos murino (Silva et al., 2011; Sá et al., 2012) ou células epiteliais (Silva et al., 2014). Os nossos resultados também se correlacionam bem com o fenótipo de forte atenuação *in vivo* em camundongos (Silva et al., 2011) e nos carneiros (Silva et al., 2013). Curiosamente, Silva et al. (2014) demonstraram que, mesmo em linhagens de células epiteliais não fagocíticas (células HeLa) a cepa $\Delta abcBA$ de *B. ovis* não foi capaz de multiplicar e sobreviver no ambiente intracelular. Mais importante, não houve diferença

estatisticamente significativa na internalização de $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ quando comparado com a cepa selvagem, o que sugere que o principal papel do transportador ABC, bem como do SST4 é principalmente na multiplicação intracelular (Starr et al., 2008; Silva et al., 2011; Sá et al., 2012; Silva et al., 2014).

Esta é a primeira descrição de tráfego intracelular de *B. ovis* em macrófagos ovinos derivados de monócitos. Este estudo confirmou que *B. ovis* escapa de compartimentos intracelulares LAMP-1⁺ em tempos iniciais de infecção, enquanto que o VCB adquire o marcador calreticulina ao longo tempo, que está associada com a multiplicação intracelular em tempos mais tardios de infecção. Estes resultados são consistentes com o que foi demonstrado para as outras espécies do gênero *Brucella*, tanto em células fagocíticas como em não fagocíticas (Celli et al., 2003; Starr et al., 2008). O SST4 codificado pelo operon *virB* de *Brucella* spp. é necessário para a maturação do vacúolo, o que em tempos mais tardios conduz à aquisição de marcadores de retículo endoplasmático pelo VCB, um acontecimento essencial para a biogênese da nicho intracelular de multiplicação de *Brucella* (Celli et al., 2003).

Durante o tráfego intracelular de *Brucella* spp., o compartimento endossomal precoce interage com lisossomos que levam a acidificação do VCB, induzindo a expressão SST4 na *Brucella* (Porte et al., 1999; Celli et al., 2003; de Jong et al., 2008). *B. ovis* expressa proteínas do *virB* tanto em meio rico neutro quanto em meio mínimo ácido (Silva et al., 2014), que está em nítido contraste com outras espécies de *Brucella* spp., sugerindo um mecanismo exclusivo para a regulação do SST4 em *B. ovis*, independente de um meio ácido. Além disso, a deleção de um transportador ABC espécie-específico ($\Delta abcBA$) de *B. ovis* interfere com a expressão de SST4 em um nível pós-transcricional, além de afetar outros fatores de virulência tais como chaperonas GroEL (BOV_A0177) e GroES (BOV_A0178), superóxido dismutase como Cu-Zn sod (SodC, BOV_A0659) e Fe-Mn Sod (SodB, BOV_0567), os quais estão envolvidos nos mecanismos de sobrevivência da bactéria diante de um ambiente intracelular adverso (Ko e Splitter, 2003; Silva et al., 2014). No entanto, apesar de uma clara interferência na biossíntese de proteínas de *B. ovis*, o crescimento *in vitro* da cepa mutante não é afetada (Silva et al., 2011). A cinética de tráfego do VCB em macrófagos ovinos é semelhante ao descrito para outras linhagens de células, incluindo células epiteliais, sugerindo que *Brucella* spp. usa mecanismos semelhantes para controlar a sua sobrevivência intracelular e multiplicação em diferentes células hospedeiras (Pizarro-Cerda et al., 1998; Celli et al., 2003; Silva et al., 2014).

Neste estudo, encontramos uma associação clara entre a infecção por *B. ovis* e o desenvolvimento de figuras de mielina, algumas das quais associadas com bactérias que foram aprisionadas em vacúolos multi-membrana. Estas estruturas são morfológicamente compatíveis com compartimentos autofágicos. Portanto, nossos resultados fornecem suporte para a via descrita recentemente para a sobrevivência intracelular de *B. abortus*, que subvertem a via autofágica na célula hospedeira (Starr et al., 2012), sugerindo que *B. ovis* explora o mesmo mecanismo de persistência no ambiente intracelular, ou seja, o tráfego através de um compartimento que contém

componentes do retículo endoplasmático rugoso, em seguida, avançar para um compartimento com características autofágicas (Celli, 2015) que pode favorecer para a propagação da infecção de uma célula hospedeira para outra (Starr et al., 2012).

O papel do NO na interação entre *Brucella* e macrófagos ao longo da infecção permanece controverso. Estudos anteriores relataram um papel menor do NO para o controle de *B. abortus* em macrófagos murinos, embora o NO seja um importante componente anti-*Brucella* em macrófagos murinos pré-estimulados com IFN- γ e infectados com *Brucella* opsonizada (Jiang et al., 1993; Sun et al., 2002). Nossos resultados indicaram um baixo nível de produção de NO em todo o curso da infecção e significativas diferenças entre WT *B. ovis* e $\Delta abcBA$ ou $\Delta virB2$ somente 48 hpi, que coincide com a fase de multiplicação de WT *B. ovis*, sugerindo que sob condições *in vitro* a produção de NO parece não ter nenhum efeito letal sobre *B. ovis*. Para as espécies clássicas lisas de *Brucella*, tais como *B. abortus* e *B. suis*, é descrito o desenvolvimento de alterações fisiológicas adaptativas que reduzem a sua susceptibilidade ao NO, o que pode explicar a capacidade de multiplicar intracelularmente desses patógenos, mesmo quando o NO está sendo produzido (Gross et al., 1998; Wang et al., 2001). Kikuchi et al. (2006) demonstraram que a enzima D-alanil-D-alanina-carboxipeptidase (DAP) contribui para a resistência contra NO e é requerida para a multiplicação intracelular de *B. abortus*. Por outro lado, os níveis mais elevados de ROS foram observados nos estágios mais iniciais da infecção, quando os números de UFC de WT e dos mutantes são recuperados em menor número, sugerindo que *B. ovis* pode ser susceptível ao efeito bactericida desses radicais, como anteriormente demonstrado para *B. abortus* (Jiang et al., 1993; Sun et al., 2002).

NO e ROS são classificados como moléculas efetoras responsáveis pela morte de vários patógenos intracelulares incluindo *Toxoplasma gondii* (Adams et al., 1990), *Leishmania* spp. (Liew et al., 1990; Mauel et al., 1991), *Mycobacterium leprae* (Adams et al., 1991), *Mycobacterium tuberculosis* (Denis, 1993) e *Legionella pneumophila* (Summersgill et al., 1992). No entanto, os patógenos desenvolveram mecanismos para subverter esses mecanismos antimicrobianos do hospedeiro. Várias moléculas são envolvidas nesses mecanismos tais como globinas, flavorubredoxina, enzimas com propriedades NO- ou S-nitrosotiol redutase e outras proteínas com propriedade redox com papéis pobremente definidos na proteção de estresse nitrosativo. Flavohemoglobina (Hmp) produzido por *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Campylobacter jejuni*, está envolvido na resistência ao NO (Poole, 2005; Lewis et al., 2015). Patógenos protozoários tais como *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi* desenvolveram mecanismos que impedem a ação microbicida do NO e das ROS gerados por células hospedeiras (Sorensen et al., 1994; Descoteaux e Turco, 1999; Sayé et al., 2014). Do mesmo modo, os agentes infecciosos micóticos incluindo *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, também têm a capacidade de impedir o dano induzido pelo NO dentro do ambiente intracelular, embora os mecanismos envolvidos nestes casos ainda sejam desconhecidos (Moreira et al., 2010; Rocco et al. 2011).

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que:

- (i) *B. ovis* é capaz de persistir e multiplicar em macrófagos ovinos;
- (ii) que a deleção do transportador ABC codificado pelos genes *abcEDCBA* ou a inativação do SST4 de *B. ovis* inibe a sua multiplicação intracelular em macrófagos ovinos;
- (iii) as cepas mutantes $\Delta abcBA$ e $\Delta virB2$ de *B. ovis* são incapazes de evadir da fusão fagolisossomo e são deficientes na maturação do vacúolo para compartimentos derivados do retículo endoplasmático, seu nicho intracelular de multiplicação;
- (i) o cultivo de macrófagos ovinos derivados de monócitos do sangue periférico mostrou-se ser um modelo adequado para estudar a infecção, interação hospedeiro/patógeno e a patogênese de *B. ovis*.

8. REFERÊNCIAS

1. ADAMS, H.; FRANZBLAU, S.G.; et al. L-Arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J. Immunol.*, v.147, p.1642-1646, 1991.
2. ADAMS, H.; HIBBS, J.J.; TAINTOR, R.; KRAHENBUHL, J. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.*, v.144, p.2725-2729, 1990.
3. BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.*, v.181, n.6, p.3733-3739, 2008.
4. BIBERSTEIN, E. L.; MCGOWAN, B.; OLANDER, H. Epididymitis in rams: studies on pathogenesis. *Cornell Vet.*, v.54, p.27-41, 1964.
5. BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. (Eds), *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, p.351-378, 1990.
6. BOSCHIROLI, M. L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: A worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.1, n.4, p.58-64, 2001.
7. BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; et al. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.341-348, 2002.
8. BOWDEN, R.A.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; et al. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.*, v.63, p.3945-3952, 1995.
9. BULGIN, M. S. *Brucella ovis* epizootic in virgin ram lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.196, p.1120-1122, 1990.
10. BURGESS, G. W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551-575, 1982.
11. BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *The Practitioner*, v.39, n.3, p.161-170, 1887.
12. CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G. The long-term culture of bovine monocytoid derived macrophages and their use in the study of intracellular

- proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.34, p.291-305, 1992.
13. 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.
 14. CARMICHAEL, L.E.; BRUNER, D.W. Characteristic of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.*, v.58, n.4, p.579-592, 1968.
 15. CARPENTER, T.E.; BERRY, S.L.; GLENN, J.S. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: computerized decision-tree analysis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.190, n.8, p.983-987, 1987.
 16. CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER M.N.; et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rum. Res.*, v.102, n.2, p.213-222, 2012.
 17. CARVALHO NETA, A.V.; MOL, J.P.S.; XAVIER, M.N.; et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J.*, v.184, n.2, p.146-155, 2010.
 18. CARVALHO NETA, A.V.; STEYNEN, A. P. R.; PAIXÃO, T. A.; et al. Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.76, p.1897-1907, 2008.
 19. CELLI, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res. Microbiol.*, v.157, n.2, p.93-98, 2006.
 20. CELLI, J. The changing nature of the *Brucella*-containing vacuole. *Cell Microbiol.*, v.17, p.951-958, 2015.
 21. CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D. M.; et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, v.1, p.545-556, 2003.
 22. CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; DE WERGIFOSSE, P.; et al. Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.*, v.138, p.1543-1550, 1992.
 23. COMERCI, D.J.; MARTINEZ-LORENZO, M.J.; SIEIRA, R.; et al. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell. Microbiol.*, v.3, n.3, p.159-68, 2001.
 24. COPIN, R.; VITRY, M.A.; HANOT MAMBRES, D.; et al. *In situ* microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathog.*, v.8, e1002575, 2012.
 25. CORBEL, M. J. Brucellosis: An overview. *Emer. Infect. Dis.*, v.3, n.2, p.213, 1997.
 26. DANESE, I.; HAINE, V.; DELRUE R.M.; et al. The Ton system, an ABC transporter, and a universally conserved GTPase are involved in iron utilization by *Brucella melitensis* 16M. *Infect. Immun.*, v.72, n.10, p.5783-5790, 2004.
 27. DELRUE, R. M.; MARTINEZ-LORENZO, M.; LESTRATE, P.; et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol.*, v.3, p.487-497, 2003.

28. DENIS, M. Interferon gamma-treated murine macrophage inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol.*, v.132, p.150-157, 1991.
29. DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1455, p.341-352, 1999.
30. DE JONG, M.F.; SUN, Y.H.; DEN HARTIGH, A.B.; et al. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulation that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol. Microbiol.*, v.70, p.1378-1396, 2008.
31. DEN HARTIGH, A.B.; SUN, Y.H.; SONDERVAN, D.; et al. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.72, p.143-49, 2004.
32. EISENBERG, T.; HAMANN, H. P.; KAIM, U.; et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, p.3753-3755, 2012.
33. ESKRA, L.; MATHISON, A.; SPLITTER, G. Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.71, p.1125-33, 2003.
34. FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO, J. M.; et al. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rum. Res.*, v.29, p.13-19, 1998.
35. FRANÇA, S.A.; MOL, J.P.S.; COSTA, E.A.; et al. Indirect ELISA for diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.1695-1702, 2014.
36. FRANCO, M. P.; MULDER, M.; GILMAN, R. H. Human brucellosis. *Lancet Infect. Diseases*, v.7, n.12, p.775-786, 2007.
37. GHIGO, E.; CAPO, C.; RAOULT, D.; et al. Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infect. Immun.*, v.69, n.4, p.2345-2352, 2001.
38. GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.*, v.36, p.313-326, 2005.
39. GODFROID, F.; CLOECKAERT, A.; TAMINIAU, B.; et al. Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M. *Res. Microbiol.*, v.151, p.655-668, 2000.
40. GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 281-297, 2002.
41. GORVEL, J.P. *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect.*, v.10, p.1010-1013, 2008.
42. 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.

43. HALL, W.H. History of *Brucella* as a human pathogen. In: YOUNG, E.J.; CORBEL, M.J (Eds), *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, p.1-10, 1989.
44. 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 to infection after inoculation of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.4, p.459-65, 1989.
45. HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Vet. J.*, v.50, n.3, p.179-180, 1997.
46. HIBBS JR J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophages effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.157, p.87-94, 1988.
47. HONG, P. C.; TSOLIS, R. M.; FICHT, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, v.68, p.4102-4107, 2000.
48. HUGHES, K.L.; CLAXTON, P.D. *Brucella ovis* infection: An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. *Aust. Vet. J.*, v.44, p.41-47, 1968.
49. JAMES, S.; GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.*, v.144, p.4794-4797, 1990.
50. JENNER, D. C.; DASSA, E.; WHATMORE, A. M.; ATKINS, H. S. ATP-Binding cassette systems of *Brucella*. *Comp. Funct. Genomics.*, v.2009, p.1-16, 2009.
51. 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.151, p.309-319, 1993.
52. KELETI, G.; FEINGOLD, D.S.; YOUNGNER, J.S. Interferon inducing in mice by lipopolysaccharide from *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.10, p.282-283, 1974.
53. KIKUCHI, H.; KIM, S.; WATANABE, K.; WATARAI, M. *Brucella abortus* d-alanyl-D-alanine carboxypeptidase contributes to its intracellular replication and resistance against nitric oxide. *FEMS Microbiol.*, v.1, n.259, p.120-125, 2006.
54. KITTELBERGER, R.; DIACK, D.S.; ROSS, G.P.; et al. An improved immunoblotting technique for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infections. *N. Z. Vet. J.*, v.45, p.75-79, 1997.
55. KO, J.; SPLITTER, G. A. *Brucella abortus* tandem repeated ATP-binding proteins, BapA and BapB, homologs of *Haemophilus influenzae* LktB, are not necessary for intracellular survival. *Microb. Pathog.*, v.29, p.245-253, 2000.
56. KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, p.65-78, 2003.
57. LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, p.60-66, 2005.

58. LEE, P.A.; TULLMAN-ERCEK, D.; GEORGIU, G. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Ver. Microbiol.*, v.60, p.373-395, 2006.
59. LEWIS, A.M.; MATZDORF, S.S.; ENDRES, J.L.; et al. Examination of the *Staphylococcus aureus* nitric oxide reductase (saNOR) reveals its contribution to modulating intracellular NO levels and cellular respiration. *Mol. Microbiol.*, v.96, p.651-669, 2015.
60. LIEW, F.Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.*, v.144, p.4794-4797, 1990.
61. LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA LANDA, A.; MORIYÓN, I.; MORENO, E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.329-339, 2002.
62. LÓPEZ-URRUTIA, L.; ALONSO, A.; NIETO, M.L.; et al. Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v.68, p.1740-1745, 2000.
63. MACEDO, A.A.; COSTA, E.A.; SILVA, A.P.C.; et al. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.151, p.294-302, 2013.
64. MARTÍN-MARTÍN, A.; CARO-HERNÁNDEZ, P.; ORDUÑA, A.; et al. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes Infect.*, v.10, p.706-710, 2008.
65. MARTÍNEZ-NÚÑEZ, C.; ALTAMIRANO-SILVA, P.; ALVARADO-GUILLÉN, F.; et al. The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.*, v.192, p.5603-5608, 2010.
66. MAUEL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMULLER-ROUILLER, V. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine dependent process that produces nitrogen derivatives. *J. Leukocyte Biol.*, v.49, p.73-82, 1991.
67. MCDERMOTT, J.; GRACE, D.; ZINSSTAG, J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev. Sci. Tech.*, v.32, p.249-261, 2013.
68. MCFARLANE, D.; SALISBURY, R.M.; OSBORNE, H.G.; et al. Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Aust. Vet. J.*, v.28, p.221-226, 1952.
69. MEYER, M. Current concepts in the Taxonomy of the Genus *Brucella*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, p.1-17, 1990.
70. MOL, J.P.S.; COSTA, E.A.; CARVALHO, A.F.; et al. Early transcriptional responses of bovine chorioallantoic membrane explants to Wild Type, $\Delta virB2$ or $\Delta btpB$ *Brucella abortus* infection. *PLoS ONE*, v.9, n.9, e108606, 2014.
71. MOLELLO, J.A.; JENSEN, R.; FLINT, J. C.; Placental pathology. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *Am. J. Vet. Res.*, v.24, p.897-904, 1963.

72. MORENO, E.; MORIYÓN, I. *The Prokaryotes*. p. 315–456 (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt, Eds.) New York, NY: Springer New York, 2006.
73. MOREIRA, A.P.; DIAS-MELICIO, L.A.; SOARES, A.M. Interleukin-10 but not transforming growth factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H₂O₂ and NO production. *Cell Immunol.*, v.263, p.196-203, 2010.
74. MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, n.12, p.958-69, 2008.
75. O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* *VirB* and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.*, v.33, p.1210–1220, 1999.
76. O'LEARY, S. N.; O'SULLIVAN, M. P.; KEANE, J. IL-10 blocks phagosome maturation in *Mycobacterium tuberculosis* infected human macrophages. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, v.45, n.1, p.172-180, 2011.
77. PAOLICCHI, F.A.; CASARO, A.P.; GIMENO, E.J.; et al. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rum. Res.*, v.36, p.7-15, 2000.
78. PIZARRO-CERDA, J.; MERESSE, S.; PARTON, R. G.; et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.*, v.66, p.5711-5724, 1998.
79. PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect.*, v.2, p.829-835, 2000.
80. PLANT, J.W.; EMAENS, G.J.; SEAMAN, J.T. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.12, p.409-412, 1986.
64. POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; SANTOS, R. L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Épizooties*, v.32, p. 105-115, 2013.
81. PORTE, F.; LIAUTARD, J.P.; KÖHLER, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.67, p.4041-4047, 1999.
82. RAJASHEKARA, G.; GLASNER, J.D.; GLOVER, D.A.; et al. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.*, v.186, n.15, p.5040-5051, 2004.
83. RIDLER, A.L.; SMITH, S.L.; WEST, D.M. Seroconversion and semen shedding in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *N. Z. Vet. J.*, v.62, p.47-50, 2014.
84. RIDLER, A.L.; WEST, D.M. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.27, n.1, p.61-66, 2011.

85. ROCCO, N.M.; CARMEN, J.C.; KLEIN, B.S. *Blastomyces dermatitidis* yeast cells inhibit nitric oxide production by alveolar macrophage inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.*, v.79, p.2385-2395, 2011.
86. ROSINHA, G.M.S.; FREITAS, D.A.; MIYOSHI, A.; et al. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect. Immun.*, v.70, p.5036-5044, 2002.
87. ROLÁN, H.G.; TSOLIS, R.M. Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.76, p.3207-3213, 2008.
88. Rossetti CA, Galindo CL, Everts RE, Lewin HA, Garner R, Adams LG. 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; 91(1): 40-51.
89. ROSSETTI, C.A.; GALINDO, C.L.; LAWHON, S.D.; et al. *Brucella melitensis* global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding *Brucella*: host initial interactions. *BMC Microbiol.*, v.9, n.81, 2009.
90. SÁ, J. C.; SILVA, T. M. A.; COSTA, E. A.; et al. The virB encode type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice. *Vet. Microbiol.*, v.159, p.130-140, 2012.
91. SALCEDO, S. P.; MARCHESINI, M. I.; LELOUARD, H. et al. *Brucella* Control of Dendritic Cell Maturation Is Dependent on the TIR-Containing Protein Btp1. *PLoS Pathog.*, v.4, n.2, e21, 2008.
92. SANGARI, F.J.; AGUERO, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity an update. *Microbiologia*, v.12, p.207-218, 1996.
93. SANTOS, R. L.; MARTINS, T. M.; BORGES, A. M.; PAIXÃO, T. A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, p.759-764, 2013.
94. SAYÉ, M.; MIRANDA, M.R.; D.I.; GIROLAMO, F.; et al. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a Novel D, L-Proline transporter. *PLoS ONE*, v.9, e92028, 2014.
95. SERAFINO, J.; CONDE, S.; ZABAL, O.; et al. 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.
96. SIEIRA, R. Regulation of virulence in *Brucella*: an eclectic repertoire of transcription factors defines the complex architecture of the *virB* promoter. *Rev. Future Microbiol.*, v.8, n.9, p.1193-1208, 2013.
97. SIEIRA, R.; AROCENA, G.M.; BUKATA, L.; et al. Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates *virB* expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *J. Bacteriol.*, v.192, p.217-224, 2010.
98. SIEIRA, R.; COMERCI, D.J.; PIETRASANTA, L.I.; et al. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* *virB* operon. *Mol. Microbiol.*, v.54, p.808-822, 2004.

99. SIEIRA, R.; COMERCI, D. J.; SANCHEZ, D. O.; UGALDE, R. A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.*, v.182, p.4849-4855, 2000.
100. SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiol.*, v. 191, n. 4-5, p. 378-87, 1994.
101. SILVA, A. P. C.; MACÊDO, A. A.; COSTA, L. F.; et al. *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet. Microbiol.*, v. 167, p. 546-553, 2013.
102. SILVA, T. M. A.; MOL, J. P. S.; WINTER, M. G.; et al. The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*. *Plos ONE*, v.12, e114532, 2014.
103. SILVA T. M. A.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, E. A. ; et al. Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect. Immun.*, v.79, p.1706-1717, 2011.
104. SILVA, A.P.C.; MACEDO, A.A.; SILVA, T.M.A.; et al. Protection of an encapsulated live attenuated strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in the murine model. *Clin.Vaccine Immunol.*, v.22, n.7, p.789-797, 2015a.
105. SILVA, A.P.C.; MACEDO, A.A.; COSTA, L.F.; et al. Encapsulated *Brucella ovis* Lacking a Putative ATP-Binding Cassette Transporter ($\Delta abcBA$) Protects against Wild Type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS ONE*, v.10, n.8, e0136865, 2015b.
106. SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDA, J.; GRILLO, M.J.; et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.29, p.125–138, 1998.
107. SORENSEN, A.L.; HEY, A.S.; KHARAZMI, A. *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS*, v.102, p.265-271, 1994.
108. STARR, T.; CHILD, R.; WEHRLY, T.D.; et al. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe*, v.11, p.33-45, 2012.
109. STARR, T.; NG, T. W.; WEHRLY, T. D. et al. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, v.9, n.5, p.678-694, 2008.
110. STEINER, M., SCHÖFER, C., MOSGOELLER, W. In situ flat embedding of monolayers and cell relocation in the acrylic resin LR white for comparative light and electron microscopy studies. *Histochem. J.*, v.26, p.934-938, 1994.
111. STOENNER, H.; LACKMAN, D. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *Am. J. Vet. Res.*, v.18, n.69, p.947-951, 1957.
112. SUMMERSGILL, J.T.; POWELL, L.A.; BUSTER, B.L.; et al. Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in γ -interferon-activated macrophages. *J. Leukocyte Biol.*, v.52, p.625-629, 1992.

113. SUN, Y.H.; ROLAN, H.G.; DEN HARTIGH, A.B.; et al. *Brucella abortus virB12* is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. *Infect. Immun.*, v.73, p.6048-6054, 2005.
114. TAM, R.; SAIER, M.H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.*, v.57, p.320-346, 1993.
115. THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. (Eds). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, p.236-247, 1993.
116. TSOLIS, R.M.; SECHADRI, R.; SANTOS, R.L.; et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PloS ONE*, v.4, n.5, p.1-9. 2009.
117. UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.*, v.84, p.712-725, 2006.
118. VAN DER HEIDE, T.; POOLMAN, B. ABC transporters : one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Reports*, v.3, p.938-943, 2002.
119. VERGER, J.M.; GRIMONT F.; GRIMONT P.A.D.; et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.35, p.292-295, 1985.
120. VIEIRA, A.L.; SILVA, T.M.; MOL, J.P.; et al. MyD88 and TLR9 are required for early control of *Brucella ovis* infection in mice. *Res. Vet. Sci.*, v.94, n.3, p.399-405, 2013.
121. VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, v.64, p.3744-51, 1996.
122. WALKER, R. L.; LEAMASTER, B. R.; STELLFLUG, J. N. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.188, p.393-396, 1986.
123. 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.
124. WHATMORE, A. M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.64, p.4120-4128, 2014.
125. XAVIER, M. N.; COSTA, E. A.; PAIXÃO, T. A. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciênc. Rural*, v.39, n.7, p.2252-2260, 2009.
126. XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P.; et al. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.*, v.40, p.149-157, 2009.
127. XAVIER, M. N.; SILVA, TEANE M.A.; COSTA, ÉRICA A.; et al. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.145, p.158-164, 2010.

128. XAVIER, M. N.; WINTER, M. G.; SPEES, A. M.; et al. CD4⁺ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *Plos Pathog.*, v.9, e1003454, 2013.
129. 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, n.7, p.2782-2786, 1996.

9. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA, Protocolo 62/2014).

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 62 / 2014, relativo ao projeto intitulado "O PAPEL DO MACRÓFAGO OVINO NA INFECÇÃO POR BRUCELLA OVIS", que tem como responsável Tatiane Alves da Paixão, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/05/2014. Este certificado expira-se em 20/05/2019.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 62 / 2014, related to the Project entitled "THE ROLE OF THE SHEEP MACROPHAGE ON BRUCELLA OVIS INFECTION", under the supervision of Tatiane Alves da Paixão, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/05/2014. This certificate expires in 20/05/2019.	
Jacqueline Isaura Alvarez Leite Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 20/05/2014.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceu a/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	