

Cláudia Emanuela Rocha

INFECÇÃO DE *LISTERIA* SPP. EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS
BOVINAS

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte – MG
2016

Cláudia Emanuela Rocha

INFECÇÃO DE *LISTERIA* SPP. EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS
BOVINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia – área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientadora Profa.: Tatiane Alves da Paixão
Co Orientador Prof.: Renato de Lima Santos

Belo Horizonte
2016

Agradecimentos

Minha história não começa dentro da UFMG e estudar nessa universidade sempre fez parte de um sonho, que agora se realiza.

Agradeço a Deus, pelas oportunidades apresentadas.

A família Rocha pelo apoio incondicional, a minha avó Nylza (in memorian), pelo exemplo de força e de fé.

Aos meus pais Paulo e Maria José e irmãos Jaques e Paula que sempre me incentivaram e acreditaram.

Ao meu marido Bruno, pela compreensão e companheirismo.

A todos os colegas do laboratório pela paciência e honestidade. A Juliana e Luíze, presença fundamental para meu aprendizado.

Aos funcionários da escola pela amizade e disponibilidade.

Aos amigos do setor de Patologia da Escola de Veterinária, pelos conselhos, carinho e sabedorias compartilhadas.

Aos animais que possibilitaram a execução desse trabalho.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos queridos professores Tatiane Paixão e Renato de Lima Santos, pela oportunidade e confiança em mim depositadas.

Em especial, a professora Tatiane Paixão que abriu as portas da universidade, me acolheu e permitiu que me torna-se sua aprendiz.

Muito obrigada.

Sumário

Resumo.....	04
Abstracts.....	05
1.Introdução.....	06
2. Revisão de literatura.....	07
2.1 Gênero <i>Listeria</i>	07
2.2 Listeriose	09
2.3 Patogênese da <i>Listeria</i> spp.	13
2.4 Resposta imune a infecção por <i>Listeria</i> spp. no útero gestante de bovino...	16
2.5 Modelos de infecção placentária por <i>Listeria</i> spp.....	18
3. Objetivos.....	21
4. Material e Métodos.....	21
5. Resultados.....	26
6. Discussão.....	33
7. Conclusão.....	37
8. Referências bibliográficas.....	37
9. Anexos.....	50
9.1 Aprovação do projeto pelo CEUA UFMG.....	50
9.2 Ata de defesa.....	52
9.3 Folha de aprovação.....	54

Resumo

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, intracelular facultativa e invasiva que tem tropismo para a placenta, e causa morbidade e mortalidade fetal em várias espécies de mamíferos. Embora a infecção por *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* sejam conhecidas como causa importante de aborto e falhas reprodutivas em bovinos, a patogênese da listeriose materno-fetal nesta espécie é pouco conhecida. Este estudo utilizou o modelo de explante de membrana corioalantóidea bovina para investigar a cinética de infecção por *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua* em células trofoblásticas da espécie bovina por até 8 horas pós-infecção. *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* foram capazes de invadir e multiplicar em células trofoblásticas sem causar morte celular ou induzir a expressão de genes pró-inflamatórios. Embora *L. innocua* tenha sido incapaz de se multiplicar em células trofoblásticas da espécie bovina e induzir a transcrição do mediador pró-inflamatório CXCL6. Este estudo demonstrou pela primeira vez a susceptibilidade das células trofoblásticas bovinas para infecção por *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. O modelo de explante de membrana corioalantóidea bovina foi adequado para estudar os mecanismos moleculares de patogênese da *Listeria* spp. em células trofoblásticas bovina, o que pode nos levar a melhor compreensão do aborto induzido por *Listeria* spp. em bovinos.

Abstract

Listeria monocytogenes is a Gram-positive, facultative intracellular and invasive bacterium that has tropism to the placenta, and causes fetal morbidity and mortality in several mammalian species. While infection by *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* are known as an important cause of abortion and reproductive failure in cattle, the pathogenesis of maternal-fetal listeriosis in this specie is poorly known. This study used the bovine chorioallantoic membrane explant model to investigate the kinetics of *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* and *L. innocua* infections in bovine trophoblastic cells for up to 8 hours post infection. *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* were able to invade and multiply in trophoblastic cells without causing cell death or inducing expression of pro-inflammatory genes. Although *L. innocua* was unable to multiply in bovine trophoblastic cells, it induced transcription of the proinflammatory mediator CXCL6. This study demonstrated for the first time the susceptibility of bovine trophoblastic cells to *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* infection. The bovine chorioallantoic membrane explant model proved to be a suitable tool for studying the molecular mechanisms of *Listeria* spp. pathogenesis in bovine trophoblastic cells, which may lead us to a better understanding of *Listeria*-induced abortion in cattle.

1. Introdução

Listeria spp. são bactérias Gram-positivo, não encapsuladas, anaeróbicas facultativas, que não esporulam e são encontradas em todo o mundo (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; POSFAY-BARBE & WALD, 2009). Existem atualmente dezessete espécies de *Listeria* descritas no gênero, mas somente *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* têm sido relatadas como agentes importantes causadores de enfermidade (LOW & DONACHIE, 1997; BUCHRIESER *et al.*, 2011). *L. monocytogenes* é considerada a espécie mais patogênica e mais frequentemente associada à doença em humanos e animais quando comparada a *L. ivanovii*. (LOW e DONACHIE, 1997; GUILLET *et al.*, 2010). *L. monocytogenes* causa enfermidade zoonótica importante denominada listeriose em animais domésticos, animais selvagens e no homem, que está frequentemente associada a epidemias de origem alimentar (LOW & DONACHIE, 1997; POSFAY-BARBE & WALD, 2009; POULSEN *et al.*, 2013). A doença é caracterizada por manifestações clínicas decorrentes da infecção sistêmica, do sistema nervoso central, do útero gestante, ou restrita ao trato gastrointestinal, independentemente da espécie animal acometida (ABRAHAMS *et al.*, 2004; LE MONNIER *et al.*, 2007; POULSEN *et al.*, 2013).

A infecção por *L. monocytogenes* em ruminantes pode provocar apresentações clínicas diversas incluindo aborto, encefalite e septicemia em neonatos (LOW & DONACHIE, 1997). Infecção por *L. ivanovii* está associada a abortos, natimortos e partos pré-maturos em ruminantes (LOW e DONACHIE, 1997). Contudo, diferentemente da *L. monocytogenes*, a *L. ivanovii* não está relacionada à meningoencefalites em ruminantes e raramente acomete o homem causando bacteremia e gastroenterite (GUILLET *et al.*, 2010; BUCHRIESER *et al.*, 2011).

Vacas gestates infectadas por *Listeria* spp. podem ou não apresentar sinais da doença como febre, perda de peso, retenção de membranas fetais (GIVENS & MARLEY, 2008), endometrite, placentite e infecção fetal (LOW & DONACHIE, 1997). O abortamento por *Listeria* spp. usualmente é observado no último trimestre de gestação (ANDERSON, 2007; GIVENS & MARLEY, 2008).

L. monocytogenes e *L. ivanovii* multiplicam-se em células fagocíticas e não fagocíticas, principalmente células epiteliais, *in vitro* em cultivo celular e *in vivo* utilizando modelo

de animais de laboratório (KARUNASAGAR *et al.*, 1993; LOW & DONACHIE, 1997; VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001, HAMON *et al.*, 2006; POSFAY-BARBE & WALD, 2009; ROULO *et al.*, 2014, POULSEN *et al.*, 2014). Nos estudos experimentais em ruminantes, o útero gestante de ovelhas e vacas é considerado altamente susceptível a infecção por *L. monocytogenes* e o abortamento ocorre quando os animais são inoculados por via intravenosa (LOW & DONACHIE, 1997). Os modelos animais de listeriose demonstram que a infecção fetal ocorre por via hematogênica através da passagem da bactéria pela barreira placentar (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

As células trofoblásticas bovinas são células epiteliais que participam da placentação e manutenção da gestação (KOSHI *et al.*, 2011). Estas células são capazes de fagocitar, invadir tecido endometrial, produzir citocinas (ATHANASSAKIS *et al.*, 2000; AMARANTE-PAFFARO *et al.*, 2004; ABRAHAMS *et al.*, 2004) e recrutar neutrófilos em resposta a infecção por *L. monocytogenes* na placenta murina (LE MONNIER *et al.*, 2007).

Existem estudos *in vitro* utilizando células da placenta humana (LECUIT *et al.*, 2004; ROBBINS *et al.*, 2010; ZELDOVICH *et al.*, 2011; CAO & MYSOREKAR, 2014) ou infecções experimentais em camundongos (ABRAM *et al.*, 2003; LE MONNIER *et al.*, 2007) que investigaram a interação de *L. monocytogenes* em células trofoblásticas a fim de compreender melhor a patogenia da doença materno-fetal. Apesar da infecção por *L. monocytogenes* ser conhecida como causa importante de abortamento e falha reprodutiva em bovinos, a patogênese nesta espécie é pouco conhecida. Desta forma, estudos que avaliem a interação de *Listeria* spp. em células trofoblásticas bovinas são importantes.

2. Revisão de literatura

2.1. Gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* pertence à família Listeriaceae, ordem Bacillales, classe Bacilli, filo Firmicutes (LIU, 2013) e constitui de um grupo de bactérias Gram positivos, anaeróbicas facultativas, catalase positivo e oxidase negativa, não esporulada e não encapsulada, em forma de bastonete (0,4-0,5 µm de comprimento por 1-1,5 µm de

largura) (LIU, 2013; VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). As colônias bacterianas são pequenas, de coloração branca leitosa e refletem a luz. São bactérias que crescem a uma temperatura entre 3 - 45°C e são móveis entre 20 a 28°C devido à presença de flagelos peritríquios (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; ALLERBERGER, 2003). A temperatura ideal para o crescimento é entre 30 e 37°, mas suportam e multiplicam a baixas temperaturas como 4°C (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; ALLERBERGER, 2003). Além disso, toleram altas concentrações de sal e baixo pH (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; POSFAY-BARBE & WALD, 2009).

Listeria spp. estão distribuídas em todo o mundo e são encontradas no solo, água, vegetais, alimentos contaminados e fezes de humanos e animais (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; POSFAY-BARBE & WALD, 2009). *Listeria* spp. são capazes de infectar vários tipos de animais predominantemente mamíferos incluindo, roedores, bovinos e pequenos ruminantes, mas também anfíbios, peixes, artrópodes e aves (HELLSTRÖM *et al.*, 2008; POSFAY-BARBE & WALD, 2009). O ciclo de contaminação é via fecal-oral principalmente no meio rural pelos ruminantes que desempenham um papel importante na manutenção de *Listeria* spp. no ambiente (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

Existem atualmente dezessete espécies de *Listeria* descritas no gênero: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis* (LIU, 2013), *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis* (DEN BAKKER *et al.*, 2014), *L. booriae*, *L. newyorkensis* (WELLER *et al.*, 2015). Contudo, somente *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas agentes importantes de listeriose (LOW & DONACHIE, 1997; BUCHRIESER *et al.*, 2011).

As espécies de *Listeria* se diferenciam de acordo com a expressão de genes e as espécies consideradas patogênicas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, apresentam genes de virulência importantes para invasão, estabelecimento e disseminação da infecção no hospedeiro (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; LIU, 2013).

2.2 Listeriose

A infecção por *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* levam a doença alimentar conhecida como listeriose (BUCHRIESER *et al.*, 2011). As demais espécies de *Listeria* são consideradas saprófitas e apatogênicas. Contudo, existem raros relatos de doença em seres humanos imunocomprometidos causada por *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (ROCOURT *et al.*, 1986; ANDRE & GENICOT, 1987; TODESCHINI *et al.*, 1998; RAPOSE & ISMAIL, 2008; VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; PERRIN *et al.*, 2003; SALIMNIA *et al.*, 2010).

L. monocytogenes é encontrada no ambiente e em alimentos contaminados como leite, queijos, patês, salsichas, saladas, carnes e produtos industrializados (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; ABRAM *et al.*, 2003; POSFAY-BARBE & WALD, 2009) favorecendo a ocorrência de doença de origem alimentar. Contudo, a transmissão pode ocorrer também por contato direto com animal contaminado (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001), por via vertical por infecção transplacentária ou através do canal de parto (SCHLECH, 2000; POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013). Silagem contaminada é considerada como fonte importante de infecção para ruminantes, contudo, *Listeria* spp. podem ser isoladas de diversos locais incluindo água, solo, alimentos e fezes em ambiente rural (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; SNAPIR *et al.*, 2006). Adicionalmente, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* têm sido isoladas nas fezes de animais e fezes de humanos saudáveis que podem carrear de forma latente a bactéria (AMMENDOLIA *et al.*, 2007; GANGULY & MUKHOPADHAYAY, 2014).

Listeriose causada por *L. monocytogenes* é caracterizada por gastroenterite auto-limitante, septicemia, perda fetal ou sinais neurológicos caracterizados por meningoencefalite tanto na espécie humana quanto nos animais (BUCHRIESER *et al.*, 2011). A manifestação da doença é dependente da dose ingerida, patogenicidade e virulência do sorotipo de *L. monocytogenes*, além dos fatores de risco do hospedeiro, podendo o *status* imunológico ser determinante (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Mais de quatorze sorotipos de *L. monocytogenes* são descritos (BORUCKI & CALL, 2003), mas 4b, 1/2a, e 1/2b são os sorotipos frequentemente relacionados à doença clínica (WIEDMANN *et al.*, 1997; VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; NADON *et al.*, 2001; BORUCKI & CALL, 2003).

Os isolados têm sido classificados por métodos de subtipagem e atualmente são descritos quatro grupos genéticos (linhagem I, II, III, e IV) de *L. monocytogenes* (ORSI *et al.*, 2011). A linhagem I inclui os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e e a linhagem II corresponde aos sorotipos 1/2a, 3a, 1/2c e 3c (BARANCELLI, *et al.*, 2011). A maioria das amostras de *L. monocytogenes* isoladas de casos clínicos humanos é pertencente a linhagem I (sorotipos 4b e 1/2b) e linhagem II (sorotipos 1/2a), principalmente em surtos e casos esporádicos, respectivamente. As amostras da linhagem II são também mais comumente isoladas de alimentos (ORSI *et al.*, 2011; BARANCELLI, *et al.*, 2011). O sorotipo 4b é o mais frequentemente associado a casos de aborto em mulheres e o 1/2b e 4b mais frequentemente isolado em pacientes não gestantes (ORSI *et al.*, 2011). Em animais, amostras pertencentes as linhagem I e II são as mais isoladas, principalmente em fezes, sendo que sorotipo 4b o mais frequentemente associado com casos clínicos em ruminantes (NIGHTINGALE *et al.*, 2004; ORSI *et al.*, 2011). Amostras pertencentes a linhagem III e IV são raras e geralmente são isoladas de animais, mas há raros relatos de casos clínicos em ruminantes (ORSI *et al.*, 2011). Estudos buscam identificar características fenotípicas associadas a virulência ao hospedeiro ou resistência ao meio ambiente possa diferenciar cada linhagem mas nenhum padrão foi ainda bem estabelecido. Aparentemente, as amostras clínicas são mais virulentas que amostras isoladas do ambiente por expressar fatores de virulência mais consistentemente (ORSI *et al.*, 2011).

Listeriose humana possui incidência relativamente baixa nos países da Europa e nos Estados Unidos, com menor patogenicidade quando comparado a outros patógenos alimentares (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). No Brasil existem diversos relatos de listeriose humana, (SUASSUNA *et al.*, 1969; HOFER & MENEZES, 1969; ESPER *et al.*, 1978; LANDGRAF *et al.*, 1999; HOFER *et al.*, 2000; SCHWAB & EDELWEISS, 2003; DE SÁ *et al.*, 2004; TOYOSHIMA *et al.*, 2006) mas por se tratar de uma doença esporádica e sem notificação, não há dados epidemiológicos consistentes.

No homem a listeriose acomete principalmente pacientes com sistema imunológico comprometido (indivíduos transplantados, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida, dependentes de hemodiálise ou em quimioterapia) e também idosos, crianças e mulheres grávidas (SCHLECH, 2000). Embora seja considerada uma doença de baixa

morbidade, em pacientes de grupos de risco pode apresentar taxa de mortalidade entre 20 e 30% (OIE, 2014).

A listeriose humana pode se manifestar na forma de septicemia ou em infecções isoladas como endocardite, arterites, pneumonia, hepatite, gastroenterite, peritonite, osteomielite, artrite (SCHLECH, 2000), dermatite pustular (LAUREYNS *et al.*, 2008), miocardite, pleurite, colecistite, sinusite, otite, conjuntivite e oftalmite (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). A infecção por *L. monocytogenes* no sistema nervoso central pode causar meningite, meningoencefalite e rombencefalite (DOGANAY, 2003). Durante a gravidez, as manifestações clínicas da doença variam de assintomáticas a sinais semelhantes à gripe com febre inespecífica (POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013) acompanhada de dores nas costas e possível infecção fetoplacentar. Esta última vem acompanhada de dor uterina, contrações e conseqüentemente parto prematuro, abortamento, morte fetal ou infecções neonatais graves e disseminadas conhecida como granulomatose infantiseptica (ABRAM *et al.*, 2003; LE MONNIER *et al.*, 2006; POSFAY-BARBE & WALD, 2009).

Relatos de listeriose humana por *L. ivanovii* são raros e os pacientes imunocomprometidos são considerados grupos de risco (SNAPIR *et al.*, 2006; DEN BAKKER *et al.*, 2010). Pacientes infectados apresentam bacteremia, gastroenterite, adenite mesentérica, perda fetal e natimorto (GUILLET *et al.*, 2010).

A listeriose em ruminantes por *L. monocytogenes* é principalmente descrita em países de clima temperado sendo menos comum em áreas tropicais e subtropicais (LAUREYNS *et al.*, 2008). Os ovinos são os mais acometidos pela doença, seguido por caprinos e bovinos (LOW & DONACHIE, 1997). Alguns relatos de listeriose encefálica bovina no Brasil são conhecidos no sul (SANCHES *et al.*, 2000; HEADLEY *et al.*, 2014) e nordeste (GALIZA *et al.*, 2010) do país. Não há levantamento específico da doença no Brasil e o diagnóstico de listeriose como causa de aborto em bovino são limitados (SILVA *et al.*, 2009).

A porta de entrada de *Listeria* spp. nos animais ocorre pelo trato gastrointestinal e semelhante ao homem, os sinais clínicos de gastroenterite aparecem 20 horas após a ingestão do alimento contaminado, com manifestações da forma invasiva da doença

ocorrendo 20 a 30 dias após a infecção (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Nos ruminantes, *L. monocytogenes* além de causar infecção encefálica, infecção uterina e septicemia neonatal, causam esporadicamente mastite (LOW & DONACHIE, 1997), ceratoconjuntivite e uveíte (LOW & DONACHIE, 1997; WARREN *et al.*, 2015). A infecção uterina resulta em abortamento no terceiro trimestre de gestação (POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013; GANGULY & MUKHOPADHAYAY, 2014), sendo descrito a partir do quarto mês de gestação, com uma semana após a exposição bacteriana (GANGULY & MUKHOPADHAYAY, 2014). As lesões placentárias são caracterizadas por placentite necrótica focal a difusa intercotiledonária e focos necróticos nas vilosidades cotiledonárias. O feto encontra-se usualmente autolizado com broncopneumonia e focos necróticos visíveis no fígado e baço. Na microscopia, esses focos necróticos são vistos como uma necrose coagulativa associada a um infiltrado inflamatório histiocítico e neutrofílico (LOW & DONACHIE, 1997). A bactéria pode ser isolada tanto da placenta quanto do feto (SCHWEIZER *et al.*, 2006; LOW & DONACHIE, 1997) e também no leite e glândula mamária de vacas em lactação (MOHAMMED *et al.*, 2009).

A infecção do sistema nervoso central por *L. monocytogenes* é conhecida como listeriose encefálica, doença neurológica que afeta bovinos, ovinos e caprinos. As manifestações clínicas são consequentes de infecção do tronco cerebral associada a meningite basilar em que os animais se movem em círculos (LOW e DONACHIE, 1997; POSFAY-BARBE & WALD, 2009). Os sinais clínicos incluem andar em círculos em uma única direção, paralisia facial unilateral, salivação excessiva, contração da pálpebra, nistagmo, dificuldade de deglutição, febre, cegueira e pressão craniana (NIGHTINGALE *et al.*, 2004; LOW & DONACHIE, 1997). O período de incubação varia entre 2 a 6 semanas (LOW & DONACHIE, 1997) e evolução da doença de 7 a 14 dias.

Microscopicamente, observa-se manguito mononuclear perivascular, infiltrado neutrofílico e formação de microabscessos no mesencéfalo, ponte, bulbo e meninges, sendo as lesões predominantemente unilaterais afetando principalmente medula oblonga e ponte (LOW & DONACHIE, 1997). A patogênese da listeriose encefálica não é bem definida, mas acredita-se que a infecção do sistema nervoso central possa ocorrer além

da via hematogênica, através dos nervos facial e trigeminal, via lesão oral pré existente (LOW & DONACHIE, 1997).

A listeriose por *L. ivanovii* tem importância econômica em rebanhos bovinos e ovinos com alimentação a base de feno ou silagem, com surtos da doença observados em períodos frios e úmidos e em lugares como Índia e Reino Unido (CHAND & SADANA, 1999; SCHMID *et al.*, 2005; DEN BAKKER *et al.*, 2010). No Brasil, não há relatos de infecção por *L. ivanovii* em bovinos, mas a espécie foi isolada de fezes de animais sadios (HOFER & MENEZES, 1969).

L. ivanovii infecta predominantemente ruminantes e pode causar enterite, septicemia neonatal e abortos (BUCHRIESER *et al.*, 2011), contudo não causa infecção do sistema nervoso central (CHAND & SADANA, 1999). Observam-se também natimortos e nascimento de crias fracas que raramente sobrevivem, principalmente em ovelhas (CHAND & SADANA, 1999). O abortamento em novilhas e vacas inseminadas é descrito de seis até nove meses de gestação (GILL *et al.*, 1997). GILL *et al.* (1997) observaram em feto bovino infectado por *L. ivanovii* autólise e fluido sanguinolento nas cavidades pleurais e peritoniais. Microscopicamente foi descrito broncopneumonia associada a infiltrado inflamatório bronquiolar e alveolar de neutrófilos, macrófagos e células gigantes. Hepatite portal linfo-histiocitária é descrita, porém necrose hepática multifocal, comumente vista na infecção por *L. monocytogenes*, não é comum nos animais infectados por *L. ivanovii* (GILL *et al.*, 1997). Endocardite fibrino hemorrágica multifocal, miocardite linfo-histiocitária e vasculite também são descritas nos fetos. Edema discreto, inflamação difusa discreta não supurativa é descrita na placenta (GILL *et al.*, 1997).

2.3 Patogênese da *Listeria* spp.

L. monocytogenes e *L. ivanovii* são capazes de invadir vários tipos celulares incluindo macrófagos, células dendríticas e células epiteliais do hospedeiro (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013; WANG *et al.*, 2014).

A bactéria após ser ingerida sobrevive e multiplica-se no lúmen intestinal, atravessa a barreira intestinal e dissemina para linfonodos mesentéricos, baço e fígado (BONAZZI

et al., 2009; GESSAIN *et al.*, 2015) e ainda apresenta a capacidade de atravessar as barreiras hematoencefálica e a fetoplacentaria (GESSAIN *et al.*, 2015).

A internalização bacteriana nas células epiteliais ocorre através da ligação de proteínas de membrana denominada internalinas a receptores celulares que provocam um processo ativo de fosforilação e rearranjo do citoesqueleto celular com indução de extensões de membrana e entrada da *L. monocytogenes* via endocitose (ROULO *et al.*, 2014). A bactéria permanece dentro de fagossomo no interior da célula do hospedeiro e inicia a expressão de listeriolisina O (LLO) e duas fosfolipases C, PlcA e PlcB, que permitem a formação poros na membrana do fagolisossomo e escape para o citoplasma celular (HAMON *et al.*, 2006; POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013). Após atingir o citoplasma, a bactéria multiplica-se e segue para a periferia da célula via ação da proteína de superfície polimerizadora de actina (ActA) que, por adição de monômeros de actina na extremidade caudal da bactéria, forma filamentos de actina que propulsionam a bactéria formando uma invaginação na membrana celular adjacente de outra célula, até que ela invade esta nova célula formando um vacúolo de dupla membrana (POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013). Para escapar dessa dupla membrana celular *L. monocytogenes* utiliza uma fosfolipase C dependente de fosfatidilcolina (Lectinase) e LLO, reiniciando o processo de multiplicação e mobilidade intracelular (POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013).

As internalinas (Inl) da *L. monocytogenes* que facilitam a aderência e internalização bacteriana nas células do hospedeiro são denominadas InlA e InlB que se ligam a receptores celulares específicos do hospedeiro como E-caderina e Met tirosina kinase, respectivamente (HAMON *et al.*, 2006; NEU *et al.*, 2013; POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013). E-caderina é uma glicoproteína de adesão intercelular dependente de cálcio expressa em todas as células epiteliais de mamíferos (MADARAME *et al.*, 2011) e que se acumula nas junções GAP entre as células epiteliais intestinais por onde *L. monocytogenes* preferencialmente penetra (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Mas E-caderina também é expressa em hepatócitos, células dendríticas, células endoteliais microvasculares cerebrais, nas células epiteliais de revestimento do plexo coróide e em trofoblastos, células consideradas potenciais alvos durante a infecção por *Listeria* spp. Já a InlB interage com três diferentes moléculas de superfície do hospedeiro: o receptor Met tirosina

kinase (c-Met) presente em uma variedade de tipos celulares de várias espécies animais, incluindo linhas celulares epiteliais e de fibroblastos (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001); no receptor de domínio globular do componente C1q do complemento (gC1qR); e nas glicosaminoglicanas (GESSAIN *et al.*, 2015).

Os dois tipos de internalinas possuem variação na especificidade celular de acordo com espécie animal devido a pequenas diferenças entre os aminoácidos nos sítios de ativação dos receptores E-caderina e c-Met, sendo estas diferenças suficientes para interferir na resistência a infecção (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; ROULO *et al.*, 2014). Assim, a interação InlA-E-caderina ocorre de maneira específica em seres humanos, cobaios, gerbilos e ratos ou camundongos humanizados que expressam E-caderina humana (GESSAIN *et al.*, 2015). Da mesma forma, a entrada dependente de InlB é também espécie específica em seres humanos, gerbilos e ratos que apresentam receptores c-Met semelhantes, mas não atuam da mesma forma em cobaios e coelhos (GESSAIN *et al.*, 2015). Em bovinos e ovinos, considerados também hospedeiros naturais da listeriose, a E-caderina é semelhante a E-caderina humana (DISSON *et al.*, , 2008), está presente em células trofoblásticas binucleadas (NAKANO *et al.*, 2005) e células do sistema nervoso central (MADARAME *et al.*, 2011).

Aparentemente, a infecção por *L. ivanovii* utiliza estratégias semelhantes a *L. monocytogenes* para infectar células e tecidos (GOUIN *et al.*, 1995) através da internalização, seguida do escape fagossomal, replicação rápida intracitoplasmática e motilidade através dos filamentos de actina para invadir a célula vizinha (DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006). Características de virulência semelhantes as duas espécies patogênicas de *Listeria* são devido a vários genes de virulência (*hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, *actA* e *prfA*) agrupados em um mesmo locus cromossomal, também conhecido como ilha de patogenicidade *Listeria 1* (LIPI-1) que codificam: LLO e fosfolipase C que contribuem para a lise da membrana fagossomal; a ActA, responsável pela motilidade e disseminação de célula a célula; as metaloproteases envolvidas na maturação de pró-*plcB*, e o fator A regulatório positivo (PrfA) responsável pelo controle de LIPI-1 e de outros genes de virulência (KIMOTO *et al.*, 2003; DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006). Estes genes que estão ausentes ou presentes na forma inativa (DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006) nas espécies *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L.*

grayi, todas consideradas bactérias não patogênicas (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

O papel das internalinas na invasão celular da *L. ivanovii* ainda é desconhecido, mas atualmente existem dois grupos de internalinas classificadas de acordo com o tamanho: as internalinas grandes (<50 kDa / associadas a superfície) como InlA e InlB e as internalinas pequenas (25-35 kDa / secretadas) como a InlC (DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006). DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.* (2006) descrevem na *L. ivanovii* duas internalinas grandes homólogas a InlB da *L. monocytogenes* e demonstram que a ausência dessas Inl impedem a multiplicação de *L. ivanovii* com perda da indução de apoptose em células renais bovinas (Madin-Darby bovine kidney - MDBK), quando comparadas a *L. ivanovii* selvagem. Adicionalmente, a *L. ivanovii* possui um gene distinto da *L. monocytogenes* conhecido como *smcL*, que codifica uma esfingomielinase caracterizada por uma forte hemólise e por ter uma ação na ruptura do fagossomo (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1989; DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006).

Dentre os escassos estudos com *L. ivanovii*, KARUNASAGAR *et al.* (1993) relatam a capacidade de *L. ivanovii* invadir linhagem de células de carcinoma de cólon humano (Caco-2), da mesma maneira que a espécie *L. monocytogenes*, contudo, GUILLET *et al.* (2010) observam diferença na capacidade de invasão de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* em linhagens de células epiteliais bovinas (MDBK) e humanas (HeLa). *L. ivanovii* demonstra ser mais invasiva nas células bovinas do que em células HeLa quando comparada *L. monocytogenes* (GUILLET *et al.*, 2010).

2.4 Resposta imune à infecção por *Listeria* spp. no útero gestante de bovino

A placenta é um órgão constituído de tecido materno e fetal em que se adapta estruturalmente e funcionalmente durante a gestação e tem a função de assegurar a nutrição fetal em todo seu desenvolvimento (BROLIO *et al.*, 2010). A barreira placentária separa o sangue materno do sangue fetal e é formado principalmente por células trofoblásticas (LE MONNIER *et al.*, 2007). Estas células participam da placentação e implantação do embrião (AMARANTE-PAFFARO *et al.*, 2004), atuam como um componente do sistema imune inato na gravidez e possuem um importante papel na proteção da transmissão vertical de patógenos para feto (LE MONNIER *et al.*, 2007; ZELDOVICH *et al.*, 2011).

A placenta bovina, formada pelas membranas fetais corion e alantóide, é do tipo cotiledonária na qual as carúnculas maternas interagem com os cotilédones fetais formando uma região denominada placentoma (BRIDGER *et al.*, 2007). A placenta é constituída por células trofoblásticas mononucleares e células trofoblásticas gigantes binucleadas (TGC). As células trofoblásticas mononucleares originam as células gigantes responsáveis pela modificação do epitélio uterino desde a implantação e permanecem até o nascimento, constituindo 15 a 20% do trofotoderma da placenta matura na superfície das vilosidades (WOODING, 1992). As células TGC migram para o placentoma e fundem-se a uma célula epitelial materna, caracterizando a placentação sinepiteliocorial (BRIDGER *et al.*, 2007). Após fundirem essas células degeneram e liberam uma variedade de proteínas e glicoproteínas que participam da manutenção da gestação como o hormônio lactogênio placentário e progesterona (WOODING, 1992; BRIDGER *et al.*, 2007; LANDIM *et al.*, 2007; BRIDGER *et al.*, 2008).

No útero da vaca gestante ocorre comunicação entre as células trofoblásticas fetal e células do sistema imune materno, presentes no endométrio bovino, para tornar o ambiente favorável ao estabelecimento da gestação ou para recrutar células de defesa para combater infecções. A presença do conceito faz com que haja mecanismos de imunossupressão como a redução da expressão de proteínas de histocompatibilidade (MHC) pelos trofoblastos, recrutamento de macrófagos no endométrio e modulação de genes relacionados à resposta imune. Por outro lado, o endométrio uterino bovino gestante é capaz de responder a infecções por meio do recrutamento de leucócitos e produção de citocinas na presença de microorganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Há poucos estudos avaliando a resposta imunológica da placenta bovina a presença de patógenos. CARVALHO NETA *et al* (2008), utilizando o modelo de explantes em membrana corioalantóide bovina, demonstraram que a infecção de células trofoblásticas por *Brucella abortus* induz a expressão de quimiocinas atrativas para neutrófilos, células que caracterizam a placentite causada por *Brucella abortus* em bovinos.

SILVA *et al* (2012) demonstram que apesar das células trofoblásticas bovinas expressarem quantidades pequenas de receptores do tipo Toll- like (TLR), responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), quando

comparada a células endometriais, os trofoblastos da região intercotiledonária respondem significativamente ao estímulo de patógenos bacterianos mortos pelo calor, causadores de aborto, como *B. abortus*, *Salmonella* sorotipo Dublin e *L. monocytogenes* com a transcrição de quimiocinas atrativas para neutrófilos como CXCL8 e CXCL6.

2.5 Modelos de infecção placentária por *Listeria* spp.

Embora a placenta seja a via de comunicação entre mãe e feto durante a gestação, é também uma barreira física e imunológica (MACHADO *et al.*, 2007). Contudo, alguns microrganismos patogênicos conseguem atravessar a placenta causando o aborto. Os mecanismos moleculares de transmissão *Listeria* spp., através da barreira materno-fetal, ainda são pouco conhecidos e há diversos estudos utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* que buscam compreender o papel das células trofoblásticas na patogenia da infecção.

O primeiro estudo experimental que avaliou a infecção por *L. monocytogenes* como causa de aborto em ruminantes foi realizado em ovelhas inoculadas por via intravenosa por HINDMARSH & BLUMER em 1932. Mais tarde, outros estudos foram realizados utilizando vacas gestantes, também inoculadas com *L. monocytogenes* por via intravenosa e demonstraram que o útero gestante é altamente suscetível à infecção (GRAHAM *et al.*, 1943; OSEBOLD *et al.*, 1960; GRAY & KILLINGER, 1966). Infecções experimentais com *Listeria* spp. também podem induzir perda fetal em animais de laboratório e ruminantes, tanto por inoculação intravenosa, quanto pelas vias oral e respiratória (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; HOELZER *et al.*, 2012). Infecções por via oral em animais gestantes nem sempre levam ao aborto, mas a infecção fetal ocorre por disseminação hematogênica via placenta e o período de incubação varia de 5 a 12 dias (revisado por LOW & DONACHIE, 1997).

Devido à habilidade da *L. monocytogenes* infectar diversas espécies de mamíferos, diferentes modelos animais, predominantemente roedores, são amplamente utilizados (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; ABRAM *et al.*, 2003; BAKARDJIEV *et al.*, 2004; LE MONNIER *et al.*, 2006; LE MONNIER *et al.*, 2007; DISSON *et al.*, 2008; ROULO *et al.*, 2014). Entretanto, há limitações em cada modelo animal utilizado, devido à: diferenças entre receptores celulares que não interagem com InIA (camundongos e ratos) ou InIB (coelhos e cobaias), diferença de resistência a infecção (chinchilla menos resistentes e ratos mais resistentes), variações nas lesões provocadas pela

infecção, caracterização ainda não adequada do modelo (gerbilos, chinchilla) e restrições éticas e econômicas (primatas não humanos) (HOELZER *et al.*, 2012).

O modelo murino é o mais utilizado, devido a viabilidade de se encontrar camundongos *knock-out* ou deficientes em genes específicos (ZENEWICZ & SHEN, 2007) e permitir estudar a resposta imunológica contra infecção por *Listeria* spp. durante a gestação (ABRAM *et al.*, 2003; LE MONNIER *et al.*, 2006). São animais susceptíveis a infecção, principalmente por via intravenosa, mas apresentam limitações no estabelecimento da infecção oral, provavelmente devido a E-caderina de enterócitos que não interage com InlA dificultando a disseminação sistêmica da *Listeria* spp. por esta via (D' ORAZIO, 2014). Adicionalmente interação de InA-E-caderina é necessária para invasão na placenta humana em modelo *in vitro* favorecendo a listeriose materno fetal (LECUIT *et al.*, 2004). Apesar de apresentarem reduzida afinidade de E-caderina e InlA, a bactéria causa infecção fetal em camundongos fêmeas, sem apresentar altas cargas bacterianas no fígado e baço materno, sugerindo que existam outros mecanismos de invasão placentária, e não exclusivamente por internalinas pela *L. monocytogenes* em células trofoblásticas nesses animais (LE MONNIER *et al.*, 2006; D' ORAZIO 2014).

Com intuito de minimizar as limitações da infecção oral por *L. monocytogenes* em camundongos foram desenvolvidos modelos de camundongos transgênicos que expressam a E-caderina e que interagem bem com InlA na superfície de enterócitos facilitando a via de infecção natural da doença (LECUIT *et al.*, 2001; HAMON *et al.*, 2006; Disson *et al.*, 2008). Adicionalmente, amostras de *L. monocytogenes* “murinizadas” com InlA geneticamente modificada para interagir com a E-caderina murina tem favorecido a infecção oral em camundongos, contudo há evidências de mudança no tropismo de InlA modificada com receptores celulares além de E-caderina, o que diferencia este modelo da listeriose no homem (D' ORAZIO, 2014).

L. monocytogenes em camundongos, multiplica-se principalmente no baço e no fígado, enquanto que na infecção por *L. ivanovii* a multiplicação bacteriana é observada principalmente no fígado. Interessantemente, camundongos infectados por *L. ivanovii* sobrevivem a primeira infecção e tornam resistentes a reinfeção, o que não acontece nas infecções por *L. monocytogenes* (HOF & HEFNER, 1988). Ao contrário do que ocorre nas infecções por *L. monocytogenes*, a infecção por *L. ivanovii* em camundongos

para causar a doença precisam ser infectados com altas doses e com inóculos inferiores a 10^6 não se observa multiplicação bacteriana. (HOF & HEFNER, 1988).

Gerbilos são considerados hospedeiros naturais da doença, contudo estudos nesses animais são escassos e limitados (HOELZER *et al.*, 2012). Os receptores celulares para InlA e InlB de gerbilos são semelhantes aos seres humanos e demonstram serem necessários para invasão bacteriana na placenta desses animais tornando-os permissivos a listeriose materno fetal (DISSON *et al.*, 2008). Recentemente, ROULO *et al.*, (2014) demonstram que a infecção oral de gerbilos gestantes com *L. monocytogenes* causa maior colonização sistêmica comparada a fêmeas não gestantes e a perda fetal ocorre somente em fêmeas infectadas com alta dose.

Os cobaios são considerados um modelo viável de infecção por via oral, contudo é necessária dose infecciosa elevada para estabelecimento da infecção (BAKARDJIEV *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2007). Interessantemente, as células da placenta de cobaios possuem a interação InlA-E-caderina de forma semelhante a que ocorre nos seres humanos, mas essa interação não demonstrou ser essencial para causar infecção nesses animais, pois mesmo a *L. monocytogenes* mutante, não expressando InlA, foi capaz de infectar os fetos de cobaios (BAKARDJIEV *et al.*, 2004). Por outro lado, estudos demonstram que a proteína ActA é necessária para estabelecimento da infecção fetal placentária (BAKARDJIEV *et al.*, 2004; LE MONNIER *et al.*, 2007).

Existem estudos *in vitro* que utilizam principalmente explantes de placenta ou linhagem células trofoblásticas humanas que avaliam a patogênese e a resposta da placenta à infecção por *Listeria* spp. (LECUIT *et al.*, 2004; AMMENDOLIA *et al.*, 2007; AMMENDOLIA *et al.*, 2009; ROBBINS *et al.*, 2010; ZELDOVICH *et al.*, 2011; DISSON & LECUIT, 2013; CAO & MYSOREKAR, 2014). *In vitro* demonstram que *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (AMMENDOLIA *et al.*, 2007) são capazes de infectar e multiplicar células de placenta humana (LECUIT *et al.*, 2004; CAO & MYSOREKAR, 2014), mas *L. ivanovii* é menos resistente e morre com 72 horas após infecção (AMMENDOLIA *et al.*, 2007). As células trofoblásticas extravilosas em explantes de placenta humana são capazes de restringir o crescimento bacteriano quando infectadas (ROBBINS *et al.*, 2010; ZELDOVICH *et al.*, 2011) e são reconhecidas em expressar mRNA para citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interferon (IFN) e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-10) (ENTRICAN, 2002).

Pouco se sabe a respeito de como *L. monocytogenes*, mesmo em ambiente não favorável, consegue perpetuar a infecção em células trofoblásticas humanas (ZELDOVICH *et al.*, 2011) e não há nenhum estudo *in vitro* que avalie a patogênese da infecção por *Listeria* spp. em linhagens celulares ou explantes derivados de placenta bovina.

3 Objetivos

Considerando-se que não há estudos que avaliem a infecção de espécies patogênicas de *Listeria* em células da placenta bovina *in vitro*, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a infecção por *Listeria* spp. em células trofoblásticas bovinas, utilizando o modelo de explante de membrana corioalantóide.

Objetivos específicos

Verificar a capacidade de invasão e multiplicação de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii* em células trofoblásticas bovinas.

Verificar a capacidade de indução de morte celular por *L. monocytogenes*, *L. innocua*, e *L. ivanovii* em células trofoblásticas bovinas.

Comparar o perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias em células trofoblásticas bovinas uma e quatro horas após infecção por *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*.

4 Material e Métodos

Confecção dos explantes de membrana corioalantóide bovina: Úteros de vacas gestantes no terço médio e final de gestação foram obtidos em abatedouros para preparação de explantes de membrana corioalantóide bovina. O tempo gestacional foi definido baseado no tamanho do feto que é mensurado da nuca a base da cauda de acordo com RICHARDSON *et al.* (1990). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob Protocolo nº. 76 / 2012 (anexo 9.1). Os explantes foram preparados como previamente descrito (CARVALHO NETA *et al.*, 2008), com modificações. O útero gestante foi aberto, após limpeza do perimétrio com álcool a 70% e álcool iodado, e avaliação macroscópica da placenta e do feto foi realizada (FIGURA 1A). As placentas sem alteração macroscópicas foram incisionadas para retirada da membrana corioalantóide e, estas, lavadas gentilmente em meio MEM (Life Technologies, EUA) com 50 µg/mL de estreptomicina e 50 U/mL de

penicilina (Pen Strep, Gibco, EUA) por 20 minutos e, posteriormente lavadas duas vezes em meio MEM sem antibiótico. As regiões intercotiledonária da membrana corioalantóide foram encaixadas nos suportes. Os explantes foram recortados e depositados cuidadosamente em placas de seis poços (FIGURA 1B) contendo meio DMEM F12 enriquecido com soro fetal bovino 10%, piruvato 1% e aminoácidos essenciais 1% (Life Technologies, EUA). Fragmentos de placenta foram coletados para detecção de DNA de *Listeria* spp. por PCR multiplex para as três espécies de *Listeria* trabalhadas (BUBERT *et al.*, 1999) e somente placentas negativas na PCR foram utilizadas nos experimentos (FIGURA 2). Os suportes utilizados na confecção do explantes foram limpos e esterilizados em hipoclorito a 3% por 24 horas, seguido pelo detergente E-toxaclean 1X (Sigma Aldrich, EUA), por 24 horas, enxágues com álcool absoluto e água destilada seguida por autoclavagem.



Figura 1. Confecção dos explantes de membrana corioalantóide bovina. A) Placenta bovina removida do útero obtido em abatedouro; B) Encaixe dos suportes na membrana corioalantóide para confecção dos explantes, depositados em uma placa de seis poços (detalhe).

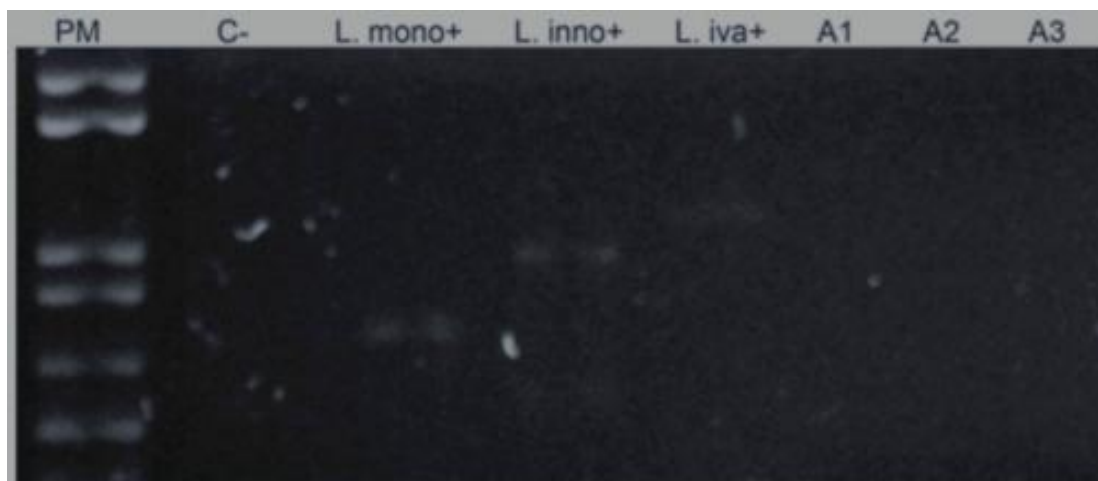


Figura 2. Resultado representativo do PCR multiplex para *L. monocytogenes* (660 pb), *L. innocua* (870 pb) e *L. ivanovii* (1200 pb). Amostras de placentas utilizadas nos experimentos (A1 a A3) foram negativas na PCR.

Preparação do inóculo: Amostras de *L. monocytogenes* (ATTC 7644), *L. innocua* (ATTC 33090) e *L. ivanovii* (ATTC 19119) foram utilizadas neste estudo. As bactérias foram crescidas em 20 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi, EUA), a temperatura de 37°C por 15 horas e sob agitação a 200 rpm. O cultivo bacteriano foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos a 22° e ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS) para mensuração de densidade óptica por espectrofotometria a OD600. A dose infectante (10^6 bactérias/mL) do inóculo foi preparada em DMEM F12 enriquecido para infecção dos explantes.

Infecção dos explantes: 200 µL de DMEM F12 enriquecido contendo 1×10^6 bactérias/mL foi adicionado na superfície trofoblástica do explante em cada poço, correspondendo à multiplicidade de infecção (MOI) de 10 bactérias por célula (MOI 1:10), considerando média de 20.000 trofoblastos por explante, como previamente descrito por (CARVALHO NETA *et al.*, 2008). Explantes não infectados foram utilizados como controle. Logo após a inoculação, as placas foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 22° e, em seguida, as placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos para a internalização bacteriana. O sobrenadante de todos os poços dos explantes foram retirados e substituídos por 200 µL de meio DMEM F12 estéril enriquecido contendo 50 µg/mL de gentamicina (Gibco, EUA). As placas então foram incubadas a 37°C por 1 hora para inativar as bactérias extracelulares. Os poços

correspondentes a cada tempo avaliado (4 e 8 horas após infecção – h.p.i) tiveram os meios substituídos por DMEM F12 enriquecido, acrescidos de 25 µg/mL de gentamicina. Ao final de 1, 4 e 8 h.p.i. os sobrenadantes de cada tempo foram removidos e os explantes lavados 1x com PBS, seguido pela lise de células trofoblásticas com 200 µL Triton X-100 (Roche, Germany) a 0,1% por 10 minutos. O conteúdo das células lisadas foram recuperados em 200 µL de PBS estéril e diluídas em volume final de 1 mL. As diluições seriadas foram semeadas em placas com BHI ágar (Kasvi, EUA) e mantidas a 37°C por 24 horas para contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

Inicialmente, para definir o MOI a ser utilizado na infecção por *L. monocytogenes*, foram utilizados nove placentas distintas e infectadas com três diferentes MOI (1:1, 1:10 e 1:100) em triplicata, sendo três placentas para cada MOI. A cinética de infecção com MOI 1:10 demonstrou ser significativo até 8 h, com os demais experimentos sendo realizados com MOI 1:10, considerado padrão, corroborando com a literatura. Em seguida, foi avaliado se haveria diferença de infecção por *L. monocytogenes* entre os terços gestacionais, utilizando placentas de diferentes animais, sendo cinco placentas do segundo trimestre de gestação (fetos medindo 20 - 35 cm) e cinco placentas do terceiro trimestre de gestação (fetos medindo 65 – 85 cm), também em triplicata. O primeiro trimestre não foi avaliado neste estudo porque o tamanho da membrana intercotiledonária limitou a utilização deste modelo. Outros seis experimentos independentes, com placentas do terceiro trimestre, foram feitos com objetivo de avaliar a cinética de infecção entre as espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*. Dessa forma, cada explante de uma mesma placenta foi infectado, separadamente, para cada espécie, ao mesmo tempo, em triplicata.

Histologia e imuno-histoquímica: Para cada experimento havia explantes destinados à histologia. Explantes não infectados e infectados com *L. monocytogenes* foram coletados nos tempos 1, 4 e 8 h.p.i. e fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas, seguida de inclusão em parafina. Cortes histológicos de 3 µm foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação microscópica do explante da membrana corioalantóidea bovina. Imuno-histoquímica foi realizada nos explantes para confirmar a localização intracelular de *L. monocytogenes* nas células trofoblásticas. Os explantes foram desparafinizados, hidratados e incubados com 4% de peróxido de hidrogênio em

PBS por 45 minutos, seguido por incubação em leite em pó (diluição 1:10) como bloqueio de solução por 60 minutos. Depois foram incubados com anticorpo primário anti-*L. monocytogenes* policlonal (Listeria O Antiserum Poly Serotypes 1,4, Difco, EUA) na diluição 1:100 (padronizado pelo grupo) por 45 minutos em uma câmara umidificada. As lâminas foram então lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado por 30 minutos a temperatura ambiente e lavadas mais uma vez em PBS e incubadas com o complexo streptavidina-peroxidase (LSAB kit; DAKO, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi relevada com solução de AEC (Dako) por 10 minutos e contra corado com hematoxilina de Mayer.

Mensuração de morte celular: Taxa de mortalidade celular foi analisada pela dosagem da enzima LDH (lactato desidrogenase) no sobrenadante celular dos explantes de membrana corioalantóide bovina não infectados (controle) ou infectados nos tempos de 1 e 8 h.p.i. e armazenados a -80°C para dosagem de LDH utilizando o kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, EUA). O volume de 50 µL de cada amostra de sobrenadante (diluídas 1:10) foi colocado na placa de 96 poços, acrescido de 50 µL do reagente *substrate mix* do kit e incubado por 15 minutos, seguida pela adição de 50µL da solução de parada do kit. Após 60 minutos, a quantificação foi realizada em comprimento de onda a 490 nm através do leitor de ELISA (EPOCH Biotech, EUA). A mortalidade total das células do explante foi obtida através da lise dos trofoblastos com *substrate mix* (CytoTox 96) conforme protocolo e a densidade ótica obtida com este tratamento foi considerada 100% de mortalidade.

Análise quantitativa PCR em tempo real: Explantes do terceiro trimestre de gestação, infectados com as diferentes espécies de *Listeria* spp., foram utilizados para extração de RNA e avaliação da transcrição de genes pró-inflamatórios e imunomodulatórios, a saber: CXCL6, CCL2, interleucinas IL-8, IL-6, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α) e Interferon tau (IFN τ). GAPDH e 18S foram utilizados como genes normalizadores. Os primers e as sondas foram customizados pelo sistema de expressão gênica Taqman (Applied Biosystems, EUA). A extração de RNA total da membrana corioalantóide bovina ocorreu após 1 e 4 h.p.i., utilizando-se Trizol Plus (Invitrogen, EUA) e as amostras armazenadas a -80°C. Um total de 1 µg de cada amostra foi tratada com DNase (Invitrogen, EUA) conforme a instrução do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA total foram verificadas por espectrometria pela razão 260/280 e em

eletroforese com gel de agarose. A transcrição reversa de 200 ng de RNA total de amostra foi feita utilizando o kit Taqman reverse transcription (Applied Biosystems, EUA), de acordo com o fabricante. A PCR quantitativa foi realizada de cada amostra em duplicata utilizando 2 µl de cDNA em volume final 20 µl por reação do TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems, EUA). Os dados foram analisados pelo método delta CT comparativo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os valores de CT foram normalizados com base na expressão de GAPDH.

Análise estatística: Após a transformação logarítmica, os valores obtidos de UFC e análise de expressão gênica foram submetidas ao teste ANOVA e comparados entre grupos pelo teste Student-Newman-Keuls. A taxa de mortalidade celular foi calculada em porcentagem e analisada por testes não paramétricos Mann Whitney ou teste Kruskal-Wallis (SAMPAIO, 2002). Análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5. (Graphpad Software, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5 Resultados

Cinética de infecção de células trofoblásticas bovina por *L. monocytogenes*

Como não existem trabalhos de infecção *in vitro* de células trofoblásticas bovinas com *L. monocytogenes*, inicialmente foi avaliada a cinética de infecção em diferentes MOI (1, 10 e 100) da bactéria em nove placentas do último trimestre de gestação. Observamos que a invasão da *L. monocytogenes* nas células trofoblásticas foi proporcional à multiplicidade de infecção, havendo diferença de invasão bacteriana no MOI 1 e MOI 100 no tempo de 1 h.p.i. Adicionalmente, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) na cinética de infecção com MOI 10 entre 1 e 8 h.p.i. (FIGURA 3). Com base nestes resultados e na literatura, os experimentos seguintes foram realizados com MOI 10. O modelo foi ainda caracterizado por análise morfológica e imunomarcção para avaliação da localização intracelular de *L. monocytogenes* em trofoblastos nos explantes (FIGURA 4). Resultados histológicos e imuno-histoquímicos confirmaram a viabilidade deste modelo para estudar a interação de *Listeria* spp. com trofoblastos bovinos *in vitro*.

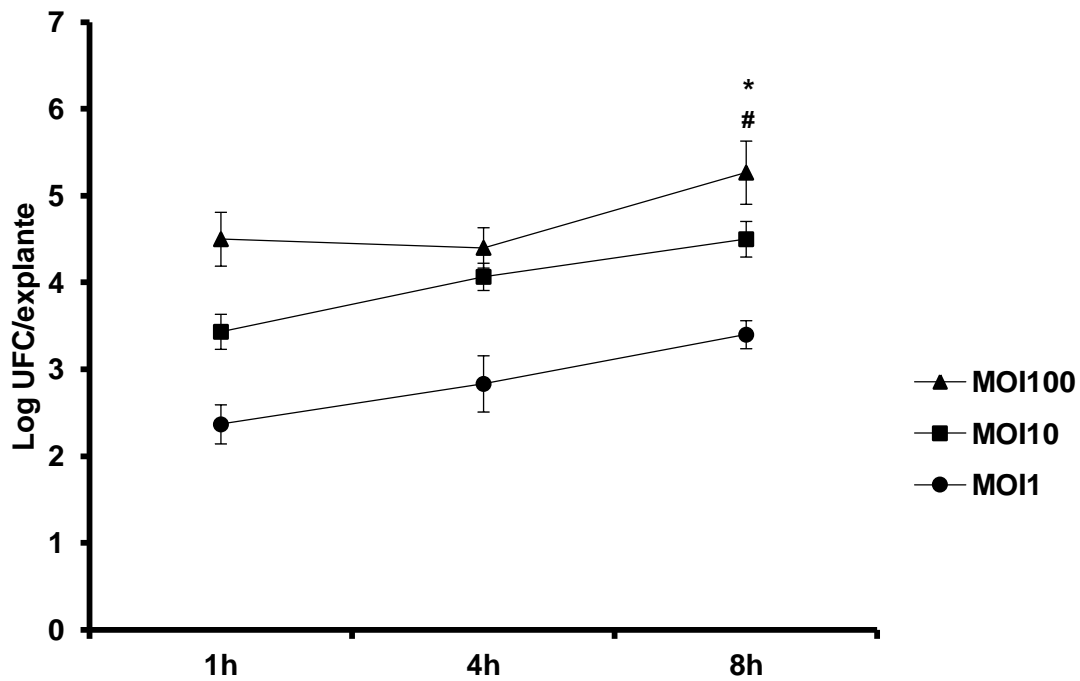


Figura 3: Infecção em explantes de membrana corioalantóide bovina por *L. monocytogenes* em diferentes MOI (1, 10, 100) Os explantes foram inoculados e bactéria intracelular mensurada 1, 4 e 8 horas após infecção. Os pontos representam as médias e erros padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas (teste Student-Newman-Keules * $P < 0,05$; diferença estatística entre tempo T1 e # $P < 0,05$; diferença estatística entre diferentes MOI).

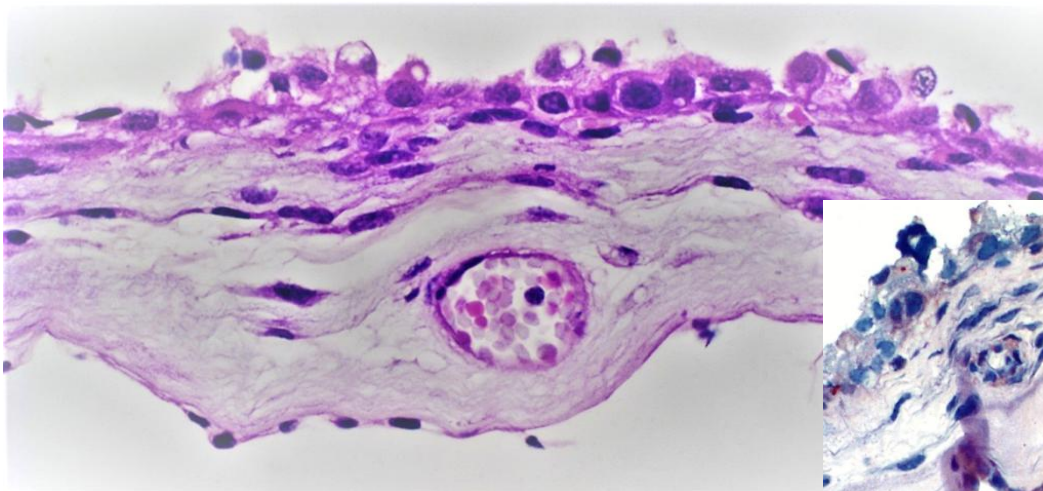


Figura 4. Explantes de membrana corioalantóide bovina. Histologia e Imuno-histoquímica anti-*Listeria monocytogenes* (detalhe) de um explante de membrana corioalantóide com 4 horas de infecção MOI 10. HE.

O abortamento por listeriose em ruminantes é visto principalmente no terço final de gestação (LOW & DONACHIE, 1997; GANGULY & MUKHOPADHAYAY, 2014). Decidiu-se avaliar se existe tropismo da bactéria por células trofoblásticas do terço final de gestação, favorecendo sua multiplicação nesta fase gestacional e corroborando com observações de campo. Para isto, avaliou-se a cinética de infecção de *L. monocytogenes* no segundo e terceiro terços gestacionais de fêmeas bovinas. Cinco placentas de vacas no segundo (3,4 a 4,8 meses) e cinco no terceiro (7,1 a 8,8 meses) trimestres de gestação foram utilizadas neste experimento. A recuperação de UFC de *L. monocytogenes* no trofoblasto bovino 1, 4 e 8 h.p.i. foi semelhante nos diferentes períodos gestacionais. (FIGURA 5). Estes resultados mostram que *L. monocytogenes* invade e multiplica em célula trofoblástica bovina independente do tempo gestacional.

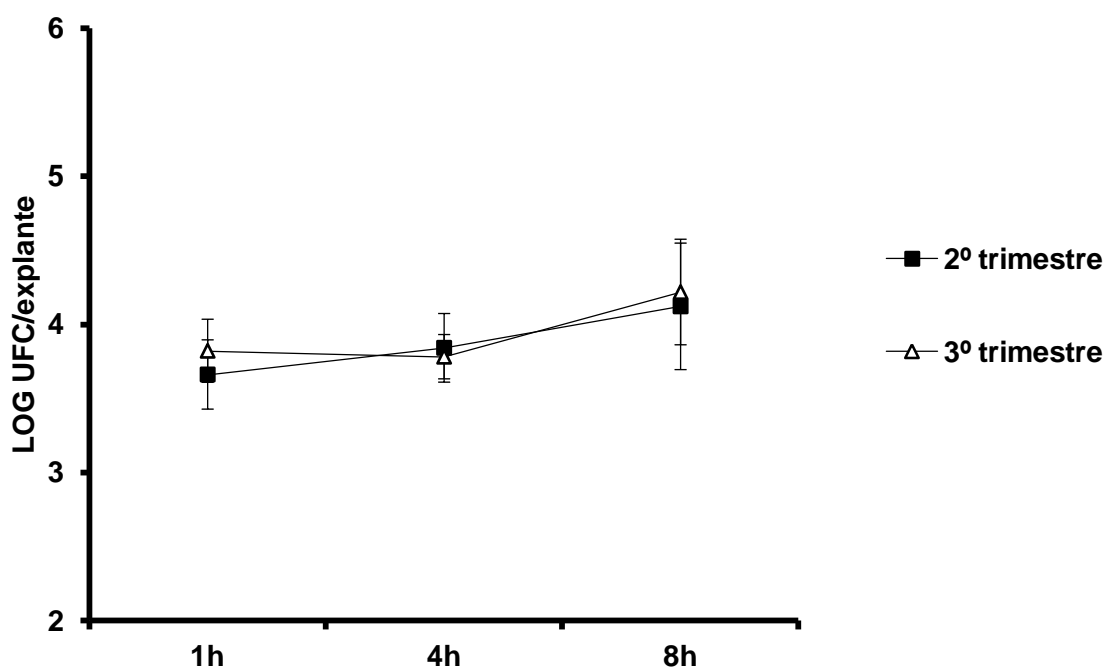


Figura 5. Cinética de infecção de *L. monocytogenes* em membrana corioalantóide bovina oriunda de placentas do segundo e terceiro terços de gestação. Explantes foram inoculados com *L. monocytogenes* a MOI 10, e bactéria intracelular recuperada 1, 4 e 8 h.p.i. Os pontos representam as médias e erros padrão de cinco experimentos independentes por grupo realizados em triplicatas.

Infecção em células trofoblásticas por diferentes *Listeria spp.*

Além da *L. monocytogenes* causar aborto em ruminantes, a *L. ivanovii* também é conhecida por causar a mesma enfermidade, porém com menor frequência (LOW e

DONACHIE, 1997). Por outro lado, a *L. innocua* é considerada uma espécie não patogênica (LE MONNIER *et al.*, 2007). Assim, com o objetivo de comparar a capacidade de invasão e multiplicação de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*, explantes de membrana corioalantóide foram infectados com as diferentes espécies de *Listeria* spp. Na primeira hora após infecção, não houve diferença ($P>0,05$) na quantidade de UFC recuperadas indicando não haver diferença na invasão de células trofoblásticas bovinas pelas três bactérias (FIGURA 6). Contudo, com 8 h.p.i. houve aumento significativo da *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* recuperadas nas células trofoblásticas e redução de *L. innocua*, comparada com 1 h.p.i. *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* foram recuperadas 1 log de UFC a mais do que *L. innocua* 8 h.p.i., indicando que *L. innocua* não foi capaz de multiplicar dentro células trofoblásticas bovinas.

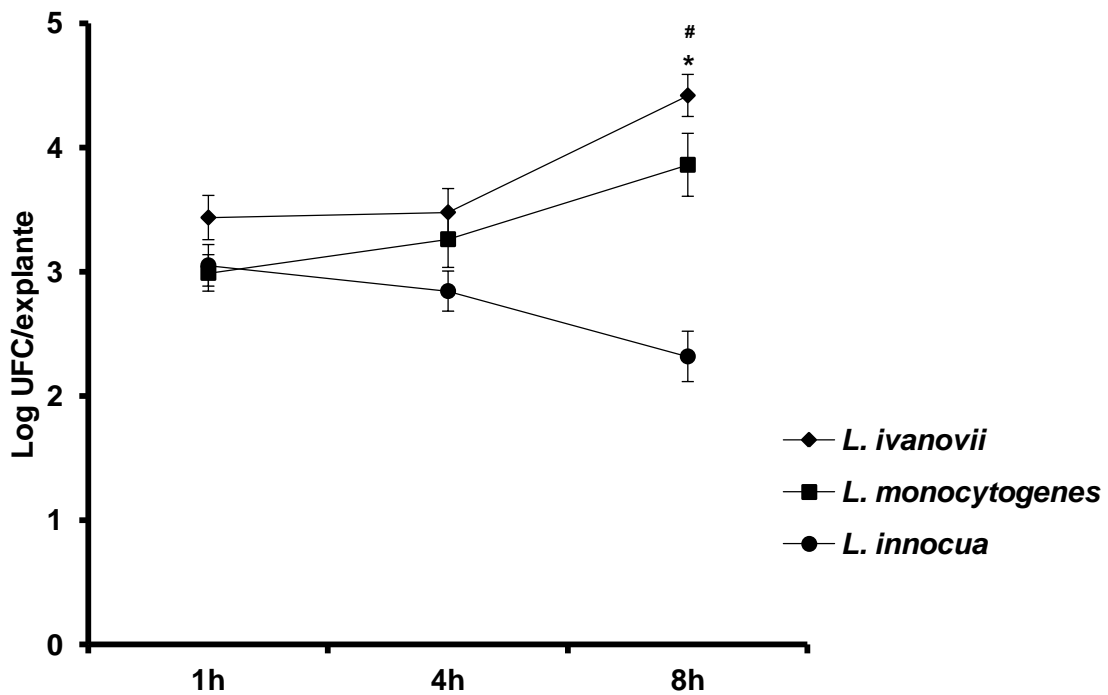


Figura 6. Infecção de explantes de membrana corioalantóide bovina com MOI 10 por *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*. Os explantes foram inoculados e bactéria intracelular recuperada 1, 4 e 8 h.p.i. Os pontos representam as médias e erro padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata (teste Student-Newman-Keules; * $P<0,05$; diferença estatística entre mesma espécie de *Listeria* sp. com 1 h.p.i. e 8 h.p.i.; # $P<0,05$; diferença estatística entre a *L. innocua* entre as outras espécies 8 h.p.i.).

Mortalidade de células trofoblásticas durante infecção por *L. monocytogenes*

Uma vez observado que *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são capazes de multiplicar no interior de células trofoblásticas bovinas no modelo de explantes de membrana corioalantóidea, buscou-se verificar se esta infecção seria capaz de causar mortalidade das células trofoblásticas até 8 h.p.i. A taxa de mortalidade celular foi determinada pela mensuração da enzima LDH nos tempos de 1 e 8 h.p.i em sobrenadante de células infectadas ou não infectadas. Interessantemente, não houve diferença ($P>0,05$) de morte celular entre os explantes controles não infectados (CT1 e CT8) e respectivos infectados (T1 e T8) com *L. monocytogenes* nos tempos de infecção determinados (FIGURA 7A) indicando que infecção bacteriana não é prejudicial às células trofoblásticas, mesmo em fase de multiplicação. Contudo, foi observada maior taxa de mortalidade celular 8 h.p.i. comparada a 1 h.p.i., tanto entre os controles quanto para os explantes infectados. O aumento do LDH no tempo de 8 horas ocorre provavelmente viabilidade limitada dos explantes em cultura. Contudo, vale ressaltar que mais 60% das células permanecem viáveis permitindo a avaliação da infecção neste modelo. A taxa de mortalidade celular foi então comparada entre células infectadas com *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii* 1 e 8 h. p.i., contudo não houve diferença ($P>0,05$) entre as espécies, que suporta a hipótese de que a multiplicação intracelular da *Listeria* não induz a morte e lise das células trofoblásticas (FIGURA 7B).

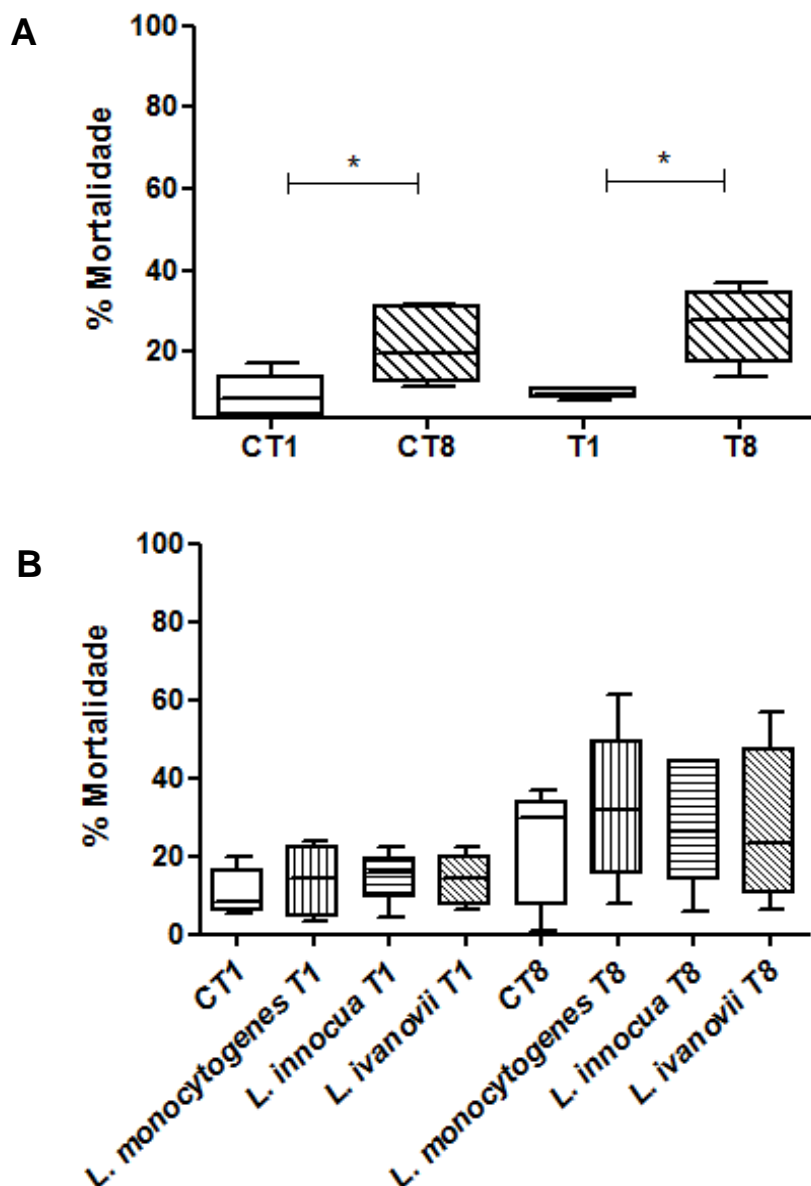


Figura 7. Taxa de mortalidade de células trofoblásticas bovinas infectadas com *Listeria* spp. A). Taxa de mortalidade celular analisada pela dosagem da enzima LDH no sobrenadante celular de explantes não infectados (CT1 e CT8) ou infectados por *L. monocytogenes* (T1 e T8) nos tempos 1 e 8 h.p.i. (B) Taxa de mortalidade celular analisada pela dosagem da enzima LDH no sobrenadante celular dos explantes não infectados (CT1 e CT8) ou infectados pelas diferentes espécies de *Listeria* spp. nos tempos 1 e 8 h.p.i. O valor de 100% de mortalidade celular foi obtido da densidade ótica de LDH mensurada em explantes que sofreram lise total das células trofoblásticas com *substrate mix* conforme kit Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Os dados são representativos de cinco experimentos independentes realizados em triplicada. (Mann Whitney *P<0,05).

Transcrição de genes pró-inflamatórios em explantes de membrana corioalantóide bovino.

Considerando que *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii* invadem e multiplicam em células trofoblásticas bovinas sem causar morte celular significativa até 8 h.p.i. neste modelo de explantes, decidiu-se verificar qual resposta inflamatória é desencadeada nas células trofoblásticas infectadas por *Listeria* spp. Foram utilizadas seis placentas de diferentes animais infectadas com *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii* e a transcrição de genes pró-inflamatórios determinada por qPCR 1 e às 4 h.p.i. Foi observada pequena, porém, maior expressão do CXCL6 em trofoblastos infectados por *L. innocua* a 4 h.p.i. Surpreendentemente, os demais genes avaliados não expressaram diferenças significativas entre as células infectadas por diferentes espécies de *Listeria* spp. nos tempos 1 e 4 h.p.i. (FIGURA 8).

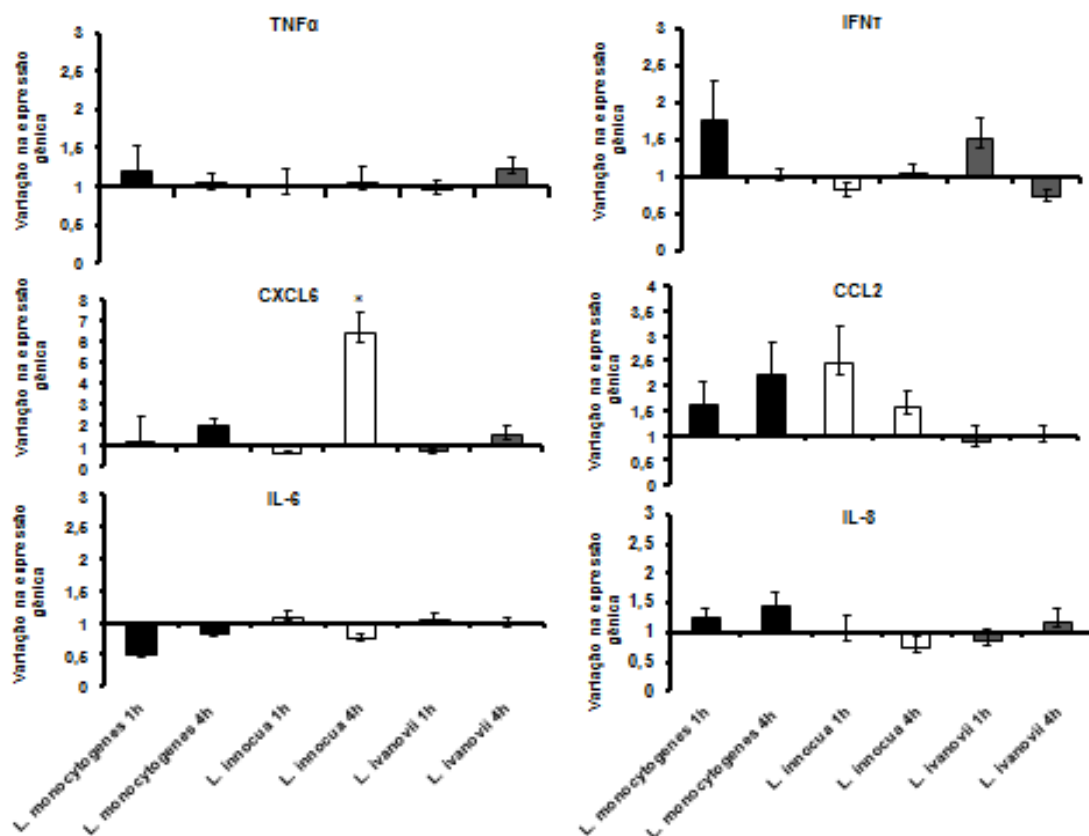


Figura 8. Transcrição de genes pró-inflamatórios em explantes de membrana corioalantóide após infecção por *Listeria* spp. Explantes foram inoculados com 1×10^6 UFC/mL de *L. monocytogenes*, *L. innocua* ou *L. ivanovii* e RNA total extraído para confecção de cDNA de mRNA por qPCR 1 e 4 h.p.i.(A-F). Os valores de Ct foram normalizados por GAPDH e os dados expressos em *fold change* comparado ao explante não infectado. Os dados representam média geométrica e erro padrão de seis experimentos independentes (teste Student-Newman-Keules * $P < 0,05$).

6. Discussão

Neste estudo através do uso de explantes de membrana corioalantóide, foi demonstrado pela primeira vez que *L. monocytogenes* é capaz de invadir e multiplicar de forma semelhante em células trofoblásticas bovinas do segundo e terceiro trimestre gestacional e que a cinética de invasão e multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, duas espécies causadoras de abortamento em ruminantes, em células trofoblásticas bovinas são semelhantes. Isto sugere que fatores de virulência necessários para sobrevivência e multiplicação em células trofoblásticas estão presentes nestas duas espécies de *Listeria* spp. e podem contribuir para ocorrência de aborto observada na listeriose. LLO e ActA são fatores de virulência conhecidos como necessários para a multiplicação de *Listeria*

em células trofoblásticas de camundongos (LE MONNIER *et al.*, 2007). Estes dois factores de virulência estão presentes em *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (DOMINGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006). No entanto, esfingomielinase C, presente apenas em *L. ivanovii* é importante para a multiplicação intracelular em linhagens de células epiteliais (GONZÁLEZ-ZORN *et al.*, 1999). Estudos genômicos mostraram diferenças entre *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* e sugerem que estas podem estar associadas com forte tropismo de *L. ivanovii* para ruminantes em comparação com a espécie humana (GONZÁLEZ-ZORN *et al.*, 1999; DOMINGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006). GUILLET *et al.* (2010) demonstraram que *L. ivanovii* é mais invasiva do que a *L. monocytogenes* em células MDBK, mas não células HeLa, que são linhagens de células bovinas e humanas, respectivamente. Embora tenha sido observado, em média, mais de 0,5 log de *L. ivanovii* intracelular quando comparado com *L. monocytogenes* sob as mesmas condições, em todos os tempos de infecção não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Tem sido relatado que o aborto bovino devido à infecção por *Listeria* spp. ocorre principalmente durante o último trimestre de gestação (LOW & DONACHIE, 1997; POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013). Contudo, o presente resultado demonstrou que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre o segundo ou terceiro trimestre de gestação, considerando invasão e sobrevivência intracelular de *Listeria* em trofoblastos bovinos. Perda fetal causada por *L. monocytogenes* em mulheres pode ocorrer em qualquer fase da gestação (POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013). Acredita-se que a infecção por *Listeria* sp. em bovinos pode causar perda fetal em qualquer fase da gestação, mas a perda embrionária raramente é reconhecida (POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013). Cabe salientar que a imunossupressão associada à gestação é reconhecida como um fator que favorece a infecção materno-fetal por *Listeria* (DOGANAY, 2003; POULSEN & CZUPRYNSKI, 2013), sendo que as características morfológicas e funcionais das células trofoblásticas em diferentes fases da gestação podem não influenciar na susceptibilidade à infecção.

O mecanismo de invasão das espécies patogênicas do gênero *Listeria* em células epiteliais ocorre de duas formas distintas: via interação de proteínas de superfície bacteriana a receptores específicos na célula do hospedeiro, ou por meio da polimerização bacteriana que permite a invasão de célula a célula. Embora, *L. innocua*,

seja amplamente conhecida como bactéria não patogênica (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001), por não expressar diversos fatores de virulência necessários para a invasão e sobrevivência intracelular (LE MONNIER, 2007). Este modelo demonstrou que a *L. innocua* foi capaz de invadir as células trofoblásticas bovinas de forma semelhante às outras espécies patogênicas, embora *L. innocua* não consiga multiplicar intracelularmente em trofoblastos bovinos. A invasão de células trofoblásticas humanas por *L. monocytogenes* requer InlA e InlB (LECUIT *et al.*, 2004). Estes fatores de invasão também são necessários para a patogênese *in vivo* em gerbilos e em camundongos humanizados que expressam E-caderina semelhante a humana (DISSON *et al.*, 2008). Em contraste, a invasão e disseminação da infecção placentária pode não exigir a interação de internalinas com E-caderina e, provavelmente, ocorre por meio da invasão direta célula a célula observada em camundongos normais, ou seja, que não apresentam versão humanizada da E-caderina (LE MONNIER, 2007; ROBBINS, *et al.*, 2010). LE MONNIER *et al.* (2007) demonstraram que *L. innocua* persiste em tecido placentário de camundongos gestantes infectados por até 2 dias, mas sem causar qualquer alteração no feto por não conseguir atravessar a barreira placentária. Não há outro indício na literatura que *L. innocua* possa invadir trofoblastos. Além disso, há evidências de que outros receptores celulares, além de E-caderina, podem interagir com outras proteínas de *Listeria* e promover a internalização das bactérias nas células epiteliais (HASHINO *et al.*, 2012). Adicionalmente, considerando que células trofoblásticas possuem atividade fagocítica, é possível que internalização de *L. innocua* possa ocorrer por fagocitose (AMARANTE-PAFFARO *et al.*, 2004) independente da InlA, proteína ausente em *L. innocua* (LECUIT *et al.*, 2004). A internalização de *Listeria* por fagocitose também tem sido descrita em macrófagos (WADSWORTH & GOLDFINE, 2002). Deste modo, sugerimos que apesar de ser totalmente invasiva em trofoblastos, a inabilidade da *L. innocua* em multiplicar em células trofoblásticas, faz com que a infecção seja restrita e autolimitante impedindo que ela dissemine para células vizinhas e tecido fetal, corroborando com aspecto apatogênico desta espécie.

Os resultados do presente estudo demonstram que nenhuma das espécies de *Listeria* spp. estudadas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, e *L. innocua*) causou morte celular das células trofoblásticas até 8 h.p.i. *Listeria* spp. induz a morte celular em trofoblasto humano infectado (POULSEN *et al.*, 2014; CHU *et al.*, 2014), bem como em outros tipos celulares (DOMINGUEZ-BERNAL *et al.*, 2006), mas a morte da célula

hospedeira induzida pela *Listeria* é observada em tempos mais tardios de infecção. A morte celular induzida por *Listeria* em célula trofoblástica bovina nunca foi avaliada anteriormente. A possibilidade de ocorrência de morte celular em tempos mais tardios de infecção não pode ser descartada com base em nossos dados, mas esta é uma limitação intrínseca do modelo de explante de membrana corioalatóide que se mantêm viáveis por apenas algumas horas (CARVALHO NETA *et al.*, 2008).

Trofoblastos bovinos são células epiteliais que participam de placentação e manutenção da gestação. Estas células têm a capacidade de realizar fagocitose, invadir os tecidos, e para produzir citocinas tais como IL-6 e IL-8 em resposta a infecção (AMARANTE-PAFFARO *et al.*, 2004; POULSEN *et al.*, 2013). As citocinas, tais como TNF α , IL-6, IL-8 desempenham papel importante no controle de listeriose por recrutamento de neutrófilos em camundongos (ABRAM *et al.*, 2003). Um estudo prévio do grupo avaliou a resposta celular de trofoblastos bovinos a *L. monocytogenes* morta pelo calor, e a indução de quimioquinas para neutrófilos foi observada após 12 horas de estimulação (SILVA *et al.*, 2012), mas o efeito da internalização das bactérias sobre resposta de células não foi avaliada. Assim, no presente trabalho avaliou-se a expressão dos genes pró-inflamatórios, citocinas TNF, IL-6, IL-8, IFN- τ e quimioquinas CXCL6 e CCL2 por *Listeria* spp. patogênicas em células trofoblásticas bovinas, e surpreendentemente não foi observado aumento na expressão destes genes até 4 h.p.i.

L. innocua foi a única bactéria que induziu expressão CXCL6 a 4 h.p.i. Embora *L. monocytogenes* induza a produção de citocinas pró-inflamatórias em células trofoblásticas (SANTOSO *et al.*, 2012; BIERNE *et al.*, 2012) e em outras linhagens de células (WADSWORTH & GOLDFINE, 2002), SANTOSO *et al.* (2012) demonstraram que ela pode inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 na linhagem celular de citotrofoblasto humano. Outros estudos demonstram que a *L. monocytogenes* é capaz de escapar da resposta imune inata por inibir a expressão inicial de genes pró-inflamatórios através do peptidoglicano desacetilado (BONECA *et al.*, 2007) ou pela internalina C (InlC), presente em *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, que prejudica a ativação da via do NF- κ B (GOUIN *et al.*, 2010). Anteriormente, CARVALHO NETA *et al.* (2008) demonstraram que *Brucella abortus*, outro importante agente causador de aborto em vacas, também atrasa as respostas pró-inflamatórias iniciais em trofoblastos bovinos.

É possível que tempos mais longos de infecção demonstrassem aumento significativo da expressão desses genes pró-inflamatórios, contudo o modelo de explante de membrana corioalantóidea limita esta avaliação considerando a diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo, independentemente da infecção.

7. Conclusão

Este estudo demonstrou pela primeira vez que a *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são capazes de invadir e multiplicar intracelularmente em trofoblastos bovinos, enquanto que *L. innocua* invade, mas é incapaz de se multiplicar no ambiente intracelular. Explantes de membrana corioalantóide bovina demonstrou ser um modelo adequado para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos patogênicos moleculares de *Listeria* spp. que estão envolvidos no aborto induzido por *Listeria* em ruminantes.

8. Referência bibliográfica

1. Abram, M., Schlüter, D., Vuckovic, D., Wraber, B., Doric, M., Deckert, M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003; 35: 177-182.
2. Abrahams, V.M., Bole-Aldo, P., Kim, Y.M., Straszewski-Chavez, S.L., Chaiworapongsa, T., Romero, R., Mor, G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J. Immunol.*, 2004; 173: 4286-4296.
3. Andre, P., Genicot, A. First isolation of *Listeria welshimeri* from human beings. *Zentbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene Abteilung I Originale Reihe A.*, 1987; 263:605–606.
4. Allerberger, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003; 35: 183-189.
5. Amarante-Paffaro, A., Queiroz, G.S., Corrêa, S.T., Spira, B., Bevilacqua, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. *Reproduction.*, 2004; 128: 207-218.
6. Ammendolia, M.G., Superti, F., Bertuccini, L., Chiarini, F., Conte, M.P., Cipriani, D., Seganti, L., Longhi, C. Invasive pathway of *Listeria ivanovii* in human amnion-derived WISH cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2007; 20: 509-518.

7. Ammendolia, M.G., Superti, F., Bertuccini, L., Seganti, L., Cipriani, D., Longhi, C. Necrotic cell death in human amniotic cells infected by *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Immunopathol Pharmacol.*, 2009; 221: 53-62.
8. Anderson, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology.*, 2007; 68: 474–486.
9. Andre, P., Genicot, A. Premier isolement de *Listeria welshimeri* chez l'homme. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology.*, 1987; 263:605-606.
10. Athanassakis I., Papadimitriou L., Bouris G., Vassiliadis S.. Interferon-gamma induces differentiation of ectoplacental cone cells to phenotypically distinct trophoblasts. *Dev. Comp. Immunol.*, 2000; 24: 663-672.
11. Barancelli, G. V., Silva-Cruz, J.V., Porto, E., Oliveira, C.A.F. "*Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública." *Arq. Instit. Biol.* 78.1., 2011; 155-168.
12. Bakardjiev, A.I., Stacy, B.A., Fisher, S.J., Portnoy, D.A. Listeriosis in the pregnant guinea pig: a model of vertical transmission. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 489–497.
13. Bierne, H., Travier, L., Mahlaköiv, T., Tailleux, L., Subtil, A., Lebreton, A., Paliwal, A., Gicquel, B., Staeheli, P., Lecuit, M., Cossart, P. Activation of type III interferon genes by pathogenic bacteria in infected epithelial cells and mouse placenta. *Plos One.*, 2012;7: e39080. doi: 10.1371/journal.pone.0039080.
14. Bonazzi, M., Lecuit, M. and Cossart, P. *Listeria monocytogenes* Internalin and E-cadherin: From Bench to Bedside. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2009; 1.
15. Borucki, M.K, Call, D.R. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41: 5537–5540.
16. Bowena, J. A., Burghardt, R. C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Seminars in Cell & Developmental Biology.*, 2000; 11: 93–104.
17. Bridger, P.S., Haupt, S., Klisch, K., Leiser, R., Tinneberg, H.-R., Pfarrer, C.. Validation of primary epitheloid cell cultures isolated from bovine placental caruncles and cotyledons. *Theriogenology.*, 2007; 68: 592–603.
18. Bridger. P. S., Haupt, S., Leiser, R., Johnson, G. A., Burghardt, R.C., Tinneberg, H.-R, Pfarrer, C. Integrin Activation in Bovine Placentomes and in Caruncular Epithelial Cells Isolated from Pregnant Cows. *Biol. Reprod.*, 2008; 79: 274-282.

19. Brolio, M.P., Ambrósio, C.E., Francioli, A.R., Morini, A.C., Guerra, R.R., Miglino, M.A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 2010; 34: 222-232.
20. Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W., Wagner, M. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999; 65: 4688-4692.
21. Buchrieser, C., Rusniok, C., Garrido, P., Hain, T., Scotti, M., Lampidis, R., Kärst, U., Chakraborty, T., Cossart, P., Kreft, J., Vazquez-Boland, J.A., Goebel, W., Glaser, P. Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. *J. Bacteriol.*, 2011; 193: 6787-6788.
22. Bundrant, B. N., Hutchins, T., den Bakker, H. C., Fortes, E., Wiedmann, M. Listeriosis outbreak in dairy cattle caused by an unusual *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2011; 23: 155–158.
23. Cao, B., Mysorekar, I.U. Intracellular bacteria in placental basal plate localize to extravillous trophoblasts. *Placenta.*, 2014; 35: 139-142.
24. Carvalho Neta, A.V., Stynen, A.P., Paixão, T.A., Miranda, K.L., Silva, F.L., Roux, C.M., Tsolis, R.M., Everts, R.E., Lewin, H.A., Adams, L.G., Carvalho, A.F., Lage, A.P., Santos, R.L. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 2008; 76: 1897-1907.
25. Cazerta, S.M.M., Miglino, M.A., Marques, R.S., Vulcano, M., Pereira, F.T.V. Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, 2007; 27(6): 229-235.
26. Chand, P.; Sadana J.R. Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Veterinary Record.*, 1999; 145: 83-84.
27. Chu, X., Chen, W., Li, N., Hu, XZ., Du, CT., Yu, SX., Zhou, M., Zhang, XJ., Jiang, GM., Han, WY., Deng, XM., Yang, YJ. Cytosolic double-stranded DNA induces nonnecroptotic programmed cell death in trophoblasts via IFI16. *J. Infect. Dis.*, 2014; 210: 1476-1486.
28. D’Orazio S.E.F. Animal models for oral transmission of *Listeria monocytogenes*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014; 4:15.
29. De Sá, F.R.N.; Sztajn bok, J.; De Almeida, J.F.L.; Troster, E.J.; Vaz, F.A.C. *Listeria monocytogenes* pneumonia in a cirrhotic child. *Int.J. Clin.Pract.*, 2004; 58: 536-538.

30. Den Bakker, H.C., Bundrant, B.N., Fortes, E.D., Orsi, R. H., Wiedmann, M. A Population Genetics-Based and Phylogenetic Approach to Understanding the Evolution of Virulence in the Genus *Listeria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010; 76: 6085–6100.
31. Den Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel, C.S., Stasiewicz, M.J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L.K., Fortes, E., Nightingale, K.K., Kephart, D., Wiedmann, M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014; 64:1882-1889.
32. Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., Ragon, M., Le Monnier, A., Babinet, C., Cossart, P., Lecuit, M. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature.*, 2008; 455: 1114-1118.
33. Doganay, M. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003; 35: 173-175.
34. Domínguez-Bernal, G., Müller-Altrock, S., González-Zorn, B., Scotti, M., Herrmann, P., Monzó, H.J., Lacharme, L., Kreft, J., Vázquez-Boland, J.A. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island. encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol. Microb.*, 2006; 59: 415–432.
35. Enriquez-Yap, E.L. The placentome of the philippine carabao (*Bubalus bubalis*) In mid-pregnancy: a study to establish the basis of clinicopathological analysis on the possible causes of early reproductive failures. *Philipp. J. Vet. Med.*, 1974; 13: 1-25.
36. Entrican, G. Immune Regulation during Pregnancy and Host–Pathogen Interactions in Infectious Abortion. *J. Comp. Pathol.*, 2002; 126: 79–94.
37. Esper, M.R.N.R., Pessoa, G.V.A., Hofer, E., Lee, I.M.L.; Melles, C.E.A.; Sakata, E.E.; Calzada, C.T. Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 1978; 38: 37-41.
38. Galiza, G.J.N., Silva, M.L.C.R., Dantas, A.F.M., Simões, S.V.D., Riet-Correa, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, 2010; 30: 267–276.

39. Ganguly, S., Mukhopadhyay, S.K. A Comprehensive Review on Reproductive Tract Infections Causing Fetal Deaths and Abortions in Large Ruminants. *Asian Pac. J. Health Sci.*, 2014; 1: 54-57.
40. Gessain, G., Tsai, Y., Travier, L., Bonazzi, M., Grayo, S., Cossart, P., Charlier, C., Disson, O., Lecuit, M. PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 2015; 212: 165-83.
41. Gill, P.A., Boulton, J.C., Fraser, G.C., Stevenson, A.E. Bovine abortion caused by *Listeria ivanovii*. *Aust. Vet. J.*, 1997; 75: 214.
42. Givens, M. D, Marley, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology.*, 2008; 70: 270–285.
43. Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., De Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueño, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., De Pablos, B., Pérez-Díaz, J.-C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science.*, 2001; 294: 849-852.
44. González-Zorn, B., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Ripio, M-T., Vega, Y., Novella, S., Vázquez-Boland, J-A. The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol. Microbiol.*, 1999; 33: 510-523.
45. Gouin, E., Mengaud, J., Cossart, P. The Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes* Is Also Present in *Listeria ivanovii*, an Animal Pathogen, and *Listeria seeligeri*, a Nonpathogenic Species. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 3550-3553.
46. Gouin, E., Dehoux, P., Mengaud, J., Kocks, C., Cossart, P. *iactA* of *Listeria ivanovii*, Although Distantly Related to *Listeria monocytogenes actA*, Restores Actin Tail Formation in an *L. monocytogenes actA* Mutant. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 2729–2737.

47. Gouin, E., Adib-Conquy, M., Balestrino, D., Nahori, M.A., Villiers, V., Colland, F., Dramsi, S., Dussurget, O., Cossart, P. The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I κ B kinase subunit IKK α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010; 107: 17333-17338.
48. Graham, R., Levine, N. D., Morrill, C. C. *Listerellosis* in domestic animals. Univ. III. Agr. Expt. Sta. Bull., 1943. 499.
49. Gray, M.L., Killinger, A.H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.*, 1966; 30: 309–382.
50. Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechai, F., Mamzer-Bruneel, M.F., Bielecka, M.K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., Lecuit, M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010; 16: 136-138.
51. Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006; 4: 423-434.
52. Hashino, M., Tachibana, M., Nishida, T., Hara, H., Tsuchiya, K., Mitsuyama, M., Watanabe, K., Shimizu, T., Watarai, M. Inactivation of the MAPK signaling pathway by *Listeria monocytogenes* infection promotes trophoblast giant cell death. *Front. Microbiol.*, 2015; 6: 1145. doi: 10.3389/fmicb.2015.01145.
53. Headley, S.A., Fritzen, J.T., Queiroz, G.R., Oliveira, R.A., Alfieri, A.F., Di Santis, G.W., Lisbôa, J.A., Alfieri, A.A. Molecular characterization of encephalitic bovine listeriosis from southern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2014; 46: 19-25.
54. Hellström, S., Kiviniemi, K., Autio, T., Korkeala, H. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. *J. Appl. Microbiol.*, 2008; 104: 883–888.
55. Hindmarsh, W. L., Blumer, C. C. Infectious abortion of sheep: preliminary report. *Australian Vet. J.*, 1932; 8:149-153.
56. Hoelzer, K., Pouillot, R., Dennis, S. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet. Res.*, 2012; 14: 43:18. doi: 10.1186/1297-9716-43-18.
57. Hof, H., Hefner, P. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection.*, 1988;16 (Suppl. 2): S141-144.

58. Hofer, E., Menezes, D.M.F. Isolamento de *Listeria monocytogenes* em secreção vaginal. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1., 1969, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: SBM., 1969. p.158.
59. Hofer, E., Ribeiro, R., Feitosa, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2000; 95: 615-20.
60. Hofer, C.B.; Melle, C.E.A.; Hofer, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 2000; 41: 375-377.
61. Jeffers, G. T., Bruce, J. L., McDonough, P. L., Scarlett, J., Boor, K. J. and Wiedmann, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology.*, 2001; 147: 1095–1104.
62. Karunasagar, I., Krohne, G., Goebel, W. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 162-169.
63. Kimoto, T., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura, T., Tsuchiya, K., Ito, Y., Watanabe, I., Kaku, T., Setianingrum, E., Mitsuyama, M. Differences in Gamma Interferon Production Induced by Listeriolysin O and Ivanolysin O Result in Different Levels of Protective Immunity in Mice Infected with *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 2447–2454.
64. Koshi, K., Ushizawa, K., Kizaki, K., Takahashi, T., Hashizume, K. Expression of endogenous retrovirus-like transcripts in bovine trophoblastic cells. *Placenta.*, 2011; 32: 493-499.
65. Landgraf, I.M.; Kobata, A.M.M.; Jakabi, M.; Kirschbaum, C.R.A.; Marchi, C.R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 1999; 58: 63-67.
66. Landim, L.P. Jr., Miglino, M.A., Pfarrer, C., Ambrosio, C.E., Garcia, J.M. Culture of mature trophoblastic giant cells from bovine placentomes. *Ani. Reprod. Sci.*, 2007; 98: 357–364.
67. Laureyns, J., Moyaert, H., Werbrouck, H., Catry, B., de Kruif, A., Pasmans, F. Pustular dermatitis by *Listeria monocytogenes* after the assisted delivery of a dead calf. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.*, 2008; 77: 29-34.
68. Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., Cossart, P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science.*, 2001; 292:1722-1725.

69. Lecuit, M., Nelson, D.M., Smith, S.D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M.C., Gordon, J.I., Cossart, P. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004; Apr 20; 101(16): 6152-6157.
70. Le Monnier, A., Join-Lambert, O.F., Jaubert, F., Berche, P., Kayal, Samer. Invasion of the Placenta during Murine Listeriosis. *Infect. Immun.*, 2006; 74: 663.
71. Liu, D. Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Nonpathogenic *Listeriae*. *Microbio. Insights.*, 2013; 6: 59–69.
72. Livak, J.; Schmittgen, D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C_t$. *Method. Methods.*, 2001; 25: 402-408.
73. Low, J.C., Donachie, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet. J.*, 1997; 153: 9-29.
74. Machado, R.Z., Mineo, T.W., Landim, L.P.Jr., Carvalho, A.F., Gennari, S.M., Miglino, M.A. Possible role of bovine trophoblast giant cells in transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2007; 16: 21-25.
75. Madarame, H., Seuberlich, T., Abril, C., Zurbriggen, A., Vandeveld, M., Oevermann, A. The distribution of E-cadherin expression in listeric rhombencephalitis of ruminants indicates its involvement in *Listeria monocytogenes* neuroinvasion. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2011; 37: 753–767.
76. Mohammed, H.O., Stipetic, K., McDonough, P.L., Gonzalez, R.N., Nydam, D.V., Atwill, E.R. Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 2009; 70: 383-388.
77. Mor, Gil. Inflammation and Pregnancy. The Role of Toll-like Receptors in Trophoblast–Immune Interaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2008; 1127: 121–128.
78. Nadon, C. A., Woodward, D. L., Young, C., RODGERS, F. G., Wiedmann, M. Correlations between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39: 2704–2707.
79. Nakano, H., Shimada, A., Imai, K., Takahashi, T., Hashizume, K. The Cytoplasmic Expression of E-Cadherin and b-catenin in bovine trophoblasts during binucleate cell differentiation. *Placenta.*, 2005; 26: 393-401.

80. Neu, C., Sedlag, A., Bayer, C., Förster, S., Crauwels, P., Niess, J., Zandbergen, G., Frascaroli, G., Riedel, C. U. CD14-Dependent Monocyte Isolation Enhances Phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by Proinflammatory, GM-CSF-Derived Macrophages. *Plos One.*, 2013; 8.
81. Nightingale, K.K., Schukken, Y.H., Nightingale, C.R., Fortes, E.D., Ho, A. J., Her, Z. Grohn, Y.T., McDonough, P.L., Wiedmann, M. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Appl. Environm. Microbiol.*, 2004; 70: 4458–4467.
82. OIE Terrestrial Manual 2014. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014 - Chapter 2.9.7. *Listeria monocytogenes*. Disponível in: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
83. Oliveira, L.J., Barreto, R.S.N., Perecin, F., Mansouri-Attia, N., Pereira, F.T.V., Meirelles, F.V. Modulation of Maternal Immune System During Pregnancy in the Cow. *Reprod. Dom. Anim.*, 2012; 47 (Suppl. 4): 384–393.
84. Orsi R. H., den Bakker H. C., Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology.*, 2011; 301: 79–96.
85. Osebold, J. W., Kendrick, J. W., Njokuobi, A. Cattle abortion associated with natural *Listeria monocytogenes* infections. Abortion of cattle experimentally with *Listeria monocytogenes*. *J. Am Vet. Med. Assoc.*, 1960; 137: 221-226, 227-234.
86. Perrin, M., Bemmer, M., Delamare, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41: 5308-5309.
87. Pitman, H., Innes, B.A., Robson, S.C., Bulmer, J.N., Lash, G.E. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. *Hum. Reprod.*, 2013; 28: 2075–2086.
88. Posfay-Barbe, K.M., Wald, E. R. Listeriosis. Seminars in fetal e neonatal medicine., 2009; 14: 228-233.
89. Poulsen, K.P. Czuprynski C.J. Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. *Anim. Health Res.Rev.*, 2013; 14: 30–39.
90. Poulsen, K.P., Faith, N.G., Golos, T.G., Giakoumopoulos, M., Czuprynski, C.J. *Listeria monocytogenes* infection reduces the functionality of human choriocarcinoma JEG-3 cells. *J. Neonatal Biol.*, 2014. 3.

91. Rapose, A., Lick, S.D., Ismail, N. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. *Transpl Infect Dis.*, 2008; 10: 434–436.
92. Richardson, C., Jones, P.C., Barnard, V., Hebert, C.N., Terlecki, S., Wijeratne, W.V. Estimation of the developmental age of the bovine fetus and newborn calf. *Vet. Rec.*, 1990; 126: 279-284.
93. Robbins, J.R., Skrzypczynska, K.M., Zeldovich, V.B., Kapidzic, M., Bakardjiev, AI. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *Plos Pathogens.*, 2010; 6. Doi: 10.1371/journal.ppat.1000732.
94. Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., Bille, J. [Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult]. *Schweiz Med Wochenschr.*, 1986; 116(8): 248–251. French.
95. Roulo, R.M., Fishburn, J.D., Amosu, M., Etchison, A.R., Smith, M.A. Dose Response of *Listeria monocytogenes* Invasion, Fetal Morbidity, and Fetal Mortality after Oral Challenge in Pregnant and Nonpregnant Mongolian Gerbils. *Infect. and Immun.*, 2014; 82: 4834–4841.
96. Salimnia, H., Patel, D., Lephart, P.R., Fairfax, M.R., Chandrasekar, P.H. *Listeria grayi*: vancomycin-resistant, gram-positive rod causing bacteremia in a stem cell transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.*, 2010; 12: 526–528.
97. Sampaio, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. *Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecia*. Belo Horizonte., 2002; pp. 198-199, 213-215.
98. Santoso, L., Friese, K., Jeschke, U., Scholz, C. Trophoblastic cell lines ACH1P and AC-1M32 react with a distinctive cytokine pattern toward *Listeria monocytogenes* and show morphologic differences. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2012; 68: 387–391.
99. Schlech, W.F. 3rd. Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 2000; 31: 770-775.
100. Schmid, M. W., Ng, E. Y.W., Lampidisc, R., Emmerthc, M., Walchera, M., Kreftc, J., Goebelc, W., Wagnerd, M., Schleifera, K. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2005; 28: 1–18.
101. Schwab, J.P.; Edelweiss, M.I.A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. *Rev. Bras. Ginecol. Obstetr.*, 2003; 25: 501-505.

102. Schweizer, G., Ehrensperger, F., Torgerson, P.R., Braun, U. Clinical findings and treatment of 94 cattle presumptively diagnosed with listeriosis. *Vet. Rec.*, 2006; 29: 588-592.
103. Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K. InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell.*, 2000; 103: 501–510.
104. Silva, A.P., Costa, E.A., Macêdo, A.A., Martins, Tda. M, Borges, A.M., Paixão, T.A., Santos, R.L. Transcription of pattern recognition receptors and abortive agents induced chemokines in the bovine pregnant uterus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2012; 145: 248-56.
105. Silva, T.M.A., da Oliveira, R. G., Mol, J.P.S., Xavier, M.N., Paixão, T. A., Cortez, A., Heinemann, M.B., Richtzenhain, L.J., Lage, A.P., Santos, R. L. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Ciência Rural.*, 2009; 39: 2563-2570. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000900028>.
106. Snapir, Y.M., Vaisbein, E., Nassar, F. Low virulence but potentially fatal outcome *Listeria ivanovii*. *Europ. J. Inter. Medic.*, 2006; 17: 286–287.
107. Suassuna, I., Santos, L.C.; Suassuna, I.R.; Pinheiro, J. Listeriose do sistema nervoso no Estado da Guanabara. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1., 1969, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: SBM., 1969. p.161.
108. Swaminathan, Bala; Gerner-Smidt, Peter. The epidemiology of human listeriosis. *Microb. Infec.*, 2007; 9: 1236-1243.
109. Todeschini, G., Friso, S., Lombardi, S., Casaril, M., Fontana, R., Corrocher, R. A case of *Listeria murray/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin’s disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 1998; 17(11): 808–810.
110. Toyoshima, M.T.K. Apanavicius, A.; Soeiro, A.M.A.; Almeida, G.M.D. de, Arai, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. *Rev. Inst. Medic.Tropic.*, 2006; 48: 291-293.
111. Travier, L., and Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a ‘classic’ virulence fator. *Current Opinion in Microbiology.*, 2014; 17: 53–60.
112. Vázquez-Boland, J.-A., Dominguez, L., Rodriguez-Ferri, E.-F., Suarez, G. Purification and Characterization of Two *Listeria ivanovii* Cytolysins, a

- Sphingomyelinase C and a Thiol-Activated Toxin (Ivanolysin O). *Infect. Immun.*, 1989; 57: 3928-3935.
113. Vázquez-Boland, J.-A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, González-Zorn, W., B., Wehland, J. , Kreft, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol.*, 2001. Rev. 14, 584–640.
114. Volokhov, D.V., Duperrier, S., Neverov, A.A., George, J., Buchrieser, C., Hitchins, A.D. The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 1928-39.
115. Wadsworth, S.J., Goldfine, H. Mobilization of protein kinase C in macrophages induced by *Listeria monocytogenes* affects its internalization and escape from the phagosome. *Infect Immun.*, 2002; 70: 4650-60.
116. Wang, C., Zhang, F., Yang, J., Khanniche, A., Shen, H. Expression of Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus Membrane-Associated Proteins in *Listeria ivanovii* via a Genome Site-Specific Integration and Expression System. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2014; 24:191–195.
117. Warren, J., Owen, A. R., Glanvill, A., Francis, A., Maboni, G. , Nova, R. J., Wapenaar, W., Rees, C., Töttemeyer, S. A new bovine conjunctiva model shows that *Listeria monocytogenes* invasion is associated with lysozyme resistance. *Vet. Microbiol.*, 2015;
118. Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., Den Bakker, H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015; 65: 286-92.
119. Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L., Batt, C. A. Ribotypes and Virulence Gene Polymorphisms Suggest Three Distinct *Listeria monocytogenes* Lineages with Differences in Pathogenic Potential. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 2707–2716.
120. Williams, D., Irvin, E.A., Chmielewski, R.A., Frank, J.F., Smith, M.A. Dose-response of *Listeria monocytogenes* after oral exposure in pregnant guinea pigs. *J. Food Prot.*, 2007; 70: 1122–1128.
121. Wimsatt, W.A. New histological observations on the placenta of the sheep. *Am. J. Anat.*, 1950; 87: 391-458.

122. Wooding, F.B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta.*, 1992; 13:101-13.
123. Zeldovich, V. B., Robbins, J. R., Kapidzic, M., Lauer, P., Bakardjiev, A. I. Invasive Extravillous Trophoblasts Restrict Intracellular Growth and Spread of *Listeria monocytogenes*. *Plos Pathogens.*, 2011; 7.
124. Zenewicz, L.A., Shen, H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect.*, 2007; 9: 1208-1215.

9. Anexos

9.1 Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 76 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Interação da *Listeria monocytogenes* com trofoblasto bovino”, 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 24/05/2012. Este certificado espira-se em 24/05/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 76 / 2012, related to the Project entitled “Interaction of *Listeria monocytogenes* in bovine trophoblast”, 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 24/05/2012. This certificate expires in 24/05/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 24/05/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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

9.2 Ata de defesa

9.3 Folha de aprovação