

Alcina Vieira de Carvalho Neta

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS
BOVINAS DURANTE A INFECÇÃO POR *Brucella abortus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Veterinária

Orientador: Renato de Lima Santos

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2007**

Assinaturas

Ao Deus Supremo...

A minha amada mãe e meu amado pai, Gracimar e Gentil meus mais valiosos presentes de vida.... Ao meu amado irmão Gustavo carinhoso companheiro... A pessoa que Deus me permitiu amar incondicionalmente, Torres Jr.

Dedico...

“Ó Senhor, tu és o meu Deus. Eu te adorarei e louvarei o teu nome, pois tens feito coisas maravilhosas; tens cumprido fielmente os planos seguros que há muito tempo decidiste fazer”

Isaias 25:1

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu supremo Senhor que me fez conquistar um sonho, superar as adversidades e como a bíblia diz, isso nos torna “mais que vencedores”...

A minha amada mãe Gracimar, prova real de luta pela vida e do milagre do amor, e ao meu amado pai, Gentil meu sempre herói e amigo, pelos ensinamentos passados, pela dedicação em todos os momentos da vida e pelo amor, carinho e cuidado sempre dedicado a mim mesmo a distância...

Ao meu amado irmão, Gustavo pelo carinho, amizade e companheirismo sempre dedicado a mim...

Ao Torres Jr., meu amor... pelo amor dedicado a mim, pelos cuidados e paciência nesta etapa tão importante de nossas vidas, pela cumplicidade e por absolutamente todos os momentos que vivemos juntos ou unidos pela saudade na distância, quando crescemos profissionalmente e amadurecemos sempre juntos, para começarmos uma nova etapa de nossas vidas... Muito melhor...

A minha tão querida família, Aretusa, Torres, Karica, Rodolfo, Sandrinha e Marcinha pelo apoio, incentivo e muito carinho sempre dedicados a mim...

A Universidade Federal de Minas Gerais por me acolher e contribuir em minha formação junto à pesquisa e a docência, área que escolhi para atuar profissionalmente...

Ao Prof. Renato de Lima Santos, meu orientador, pela confiança, paciência, ensinamentos e, sobretudo, por querer fazer de mim uma profissional completa, como ele próprio...

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, por ter acreditado e confiado em mim desde o início e por sua presença sempre constante nos bons e maus momentos, como incentivador e colaborador essencial na realização deste trabalho...

As minhas queridas professoras Rogéria e Natália pelo conhecimento transmitido, pelo constante incentivo, apoio e amizade em todos os momentos...

Aos professores Ernane Fagundes e Roberto Guedes pelos valiosos ensinamentos durante esta etapa da minha formação...

A professora e amiga Roselene Ecco pela amizade, carinho e exemplo perseverança...

As queridíssimas técnicas do laboratório de patologia, Mel e Marilene não somente pela participação no processamento de material, mas pelo carinho e momentos alegres vividos no laboratório... E ao Adão também querido pela ajuda sempre presente...

As amigas irmãs mineiras, Tatiane, Silvia França e Fabiana, verdadeiros anjos na minha vida que compartilharam comigo todos os momentos dessa trajetória, com sorrisos, lágrimas, mas acima de tudo a mais sincera amizade... Uma das conquistas mais valiosas desse importante momento de minha vida...

As amigas Catarinense, Baiana e Carioca, Aline Viott, Catarina e Joana pelo abrigo aconchegante nesta etapa final do doutorado, mas principalmente pelo cuidado e carinho dedicados nesse momento delicado. Em especial a minha doce Li pela amizade minha mais recente conquista do doutorado...

As amigas Andreza e Gissandra pelos momentos felizes, regados por muitos sorrisos que ajudaram a superar os momentos difíceis... Em especial a Andreza minha companheira de morada por fazer dessa temporada de doutorado em BH mais agradável e alegre...

Aos amigos de sucesso Regina, Soraia, Marcos, Taismara, Eveline, Edmilson que já seguiram seu caminho profissional, mas que deixaram muito boas lembranças...

Aos amigos do laboratório de Patologia: Mariana, Teane, Raquel, Jankerle, Aline, Fábio, Núbia, Silvia Pacheco, Cintia, Juneo, Marina, Juliana, Samanta, Paulo e Antonio pelo companheirismo e convivência agradável que serão sempre guardados em meu coração e lembrança...

As amigas do laboratório de Bacteriologia pela convivência divertida: em especial a Ana Paula, Karina e Telma que incentivaram e participaram ativamente do trabalho, a Ana Cláudia, Silvia, Keila, e aos meninos de IC, sempre muito prestativos nos momentos importantes...

Aos meus fiéis amigos Patrícia, Árina, Ferdinan e Lívio por estarem comigo em tantos momentos de minha vida sempre amorosos e dedicados e por participarem mesmo à distância de mais essa conquista...

A todos os colegas e professores da Universidade Estadual do Maranhão pela confiança, ajuda e por fazerem parte da minha formação... e sobretudo à professora Ana Lúcia, minha mestre, e porque não dizer mãe na ciência, pois me fez acreditar em um sonho que hoje realizo...

Ao matadouro RM pela contribuição no fornecimento do material de pesquisa...

A FNS pelo financiamento do projeto e ao CNPq pelo suporte financeiro que permitiu de fato a realização e conclusão desse sonho profissional...

Ao Instituto Ludwig, em especial ao Dr. Luis Fernando e ao Dr. Alex pela disponibilidade em abrir as portas do laboratório para realização dos ensaios de microarranjo...

Ao Dr. Almir do laboratório de fisiologia (ICB-UFMG) por disponibilizar a máquina de PCR em tempo real para realização da pesquisa.

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

Meu sincero muito obrigada !!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	12
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura	15
Brucelose.....	15
Brucelose bovina	15
Invasão das células do hospedeiro por <i>Brucella abortus</i>	19
Sobrevivência intracelular de <i>Brucella abortus</i>	20
Determinantes moleculares de virulência envolvidos na patogênese de <i>Brucella abortus</i>	21
Resposta imune do hospedeiro contra <i>Brucella abortus</i>	23
CAPÍTULO 2: Avaliação de um modelo de estudo da patogênese da brucelose bovina através do explante da membrana corioalantóideia.....	27
Introdução	27
Material e métodos.....	27
Resultados e discussão	33
CAPÍTULO 3: Perfil de expressão gênica em trofoblastos bovinos infectados com <i>Brucella abortus</i>	39
Introdução	39
Material e métodos.....	40
Resultados e discussão	41
CAPÍTULO 4: Expressão de citocinas e quimiocinas em células trofoblásticas bovinas durante infecção por <i>Brucella abortus</i>	52
Introdução	52
Material e métodos.....	53
Resultados e discussão	54
CONCLUSÃO.	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de genes e iniciadores para o PCR em tempo real	41
Tabela 2. Genes de expressão aumentada na membrana corioalantóidea infectada com <i>Brucella abortus</i> 4 horas após inoculação.....	47
Tabela 3. Genes de expressão reduzida na membrana corioalantóidea infectada com <i>Brucella abortus</i> 4 horas após inoculação.....	48
Tabela 4. Lista de genes e iniciadores para o RT-PCR em tempo real	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da coleta de material e confecção dos explantes da membrana corioalantóidea. (A) Assepsia do útero bovino em terço final de gestação. (B) Exposição da membrana cório-alantóidea. (C) Retirada de um segmento da membrana cório-alantóidea. (D) e (E) Preparação dos explantes da membrana cório-alantóidea. (F) Preparação da placa de cultivo dos explantes para inoculação com <i>B. abortus</i>	31
Figura 2. Explantes da membrana cório-alantóidea mantidas em cultivo por 48 horas, composta do epitélio colunar simples, tecido conjuntivo subepitelial e camada de células amnióticas. As células trofoblásticas estão indicadas com as setas, em maior aumento do lado direito. A letra “A” do lado esquerdo indica as células amnióticas. Bovino. HE.....	33
Figura 3. Número de bactérias quantificadas na contagem bacteriológica de UFC/trofoblasto em diferentes tempos de infecção utilizando o “drop count method” (Miles e Misra, 1938). As colunas indicam médias e desvio padrão.....	35
Figura 4. Localização imunoistoquímica de <i>Brucella abortus</i> (setas) na célula trofoblástica do explante da membrana cório-alantóidea. Bovino. Complexo estreptoavidina-peroxidase.	35
Figura 5. Gel de agarose-formaldeído evidenciando amostras de RNA obtidas da extração da membrana corioalantóidea bovina. São observadas as bandas de RNA ribossomal 28S (4,7kb) e 18S (1,9kb).....	43
Figura 6. Gel de agarose mostrando a amplificação de parte do gene GAPDH, a partir do cDNA obtido da transcrição reversa de amostras de RNA total extraídos da membrana corioalantóidea bovina.	43
Figura 7. Imagem representativa da intensidade de fluorescência obtida nos microarranjos após hibridização. Cada círculo representa um gene marcado com os fluorocromos (Alexa 555 e Alexa 647).....	43
Figura 8. Intensidade de marcação dos corantes utilizados nas amostras experimentais. Amostras controle marcadas com Alexa 555 (verde) e amostras infectadas com <i>B. abortus</i> marcadas com Alexa 647 (vermelho). A representação gráfica demonstra a mesma intensidade de marcação dos dois corantes, condição ideal para análise dos dados.....	45
Figura 9. Análise da expressão gênica usando o microarranjo de alta densidade, com 13.249 oligonucleotídeos. Representação da variação de expressão de todos os genes representados no microarranjo, sendo que eixo esquerdo indica a intensidade das amostras controle (arbitrariamente	

estabelecida como valor = 1) e o eixo direito representa a intensidade do sinal durante a infecção por *B. abortus*. Cada feixe do prisma representa um gene avaliado e marcado durante o ensaio. 45

Figura 10. Representação dos genes selecionados após análise das variações de expressão (mínimo de 2 vezes), com expressão diferencial estatisticamente significativa ($p < 0.05$), quando comparados os experimentos independentes. O eixo esquerdo indica a intensidade das amostras controle (arbitrariamente estabelecida como valor = 1) e o eixo direito representa a intensidade do sinal durante a infecção por *B. abortus*. Quanto mais distante de 1, maior é a expressão diferencial. 45

Figura 11. Expressão de genes relacionados à resposta imune e inflamação através do RT-PCR em tempo real em explantes da membrana corioalantóidea infectada com *Brucella abortus* às 4 horas após inoculação. As colunas indicam média e erro padrão da variação na quantidade de mRNA em relação aos explantes controle não-infectados, para os genes indicados na figura. 50

Figura 12. Quantificação da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias por RT-PCR em tempo real em trofoblastos de explantes da membrana corioalantóidea infectada com *Brucella abortus* às 6 e 12 horas após a infecção. Há diferença estatisticamente significativa entre os valores de *GCP-2 ($p = 0.0172$) e ** IL-8 ($p = 0.0184$), entre 6 e 12 horas após a infecção. As variações de expressão das citocinas avaliadas foram obtidas em relação aos respectivos grupos controle nos tempos estudados. 55

Figura 13. Carúncula bovina. A) Placenta após o parto sem alteração. Animal com bacteriologia negativa. Observam-se grupos de células da placenta fetal (vilosidade coriônica) envoltas por células da placenta materna das criptas carunculares (seta). B) Placentite necrótica moderada com infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal (seta), animal com bacteriologia positiva e gestação a termo. C) Placentite necro-hemorrágica acentuada com infiltrado neutrofílico intenso multifocal a coalescente e grande quantidade de bactérias intralesionais (seta). Animal com bacteriologia positiva e manifestação de aborto. HE. 59

Figura 14. Expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias na placenta de bovinos infectados com *Brucella abortus* nos grupos com bacteriologia positiva e gestação a termo ou com bacteriologia positiva e aborto. As variações de expressão das citocinas avaliadas foram obtidas em relação aos respectivos controles dos grupos estudados. As colunas indicam médias e erro padrão, os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo controle (bacteriologia negativa) e os grupos com bacteriologia positiva com e sem aborto ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa entre o grupo com gestação a termo e o grupo que manifestou aborto ($p > 0,05$). 61

RESUMO

A brucelose bovina, causada pela *Brucella abortus*, tem grande importância por ocasionar abortos, particularmente no terço final da gestação. O estudo da interação entre *B. abortus* e a célula trofoblástica é fundamental para o entendimento da patogênese da placentite induzida por *B. abortus*. Com objetivo de estudar o perfil de expressão gênica na placenta bovina durante a infecção por *B. abortus* estabeleceu-se o cultivo de trofoblastos através de explantes da membrana córrio-alantóidea, como alternativa para o estudo *ex vivo* da patogênese da brucelose bovina. Foram confeccionados explantes da membrana córrio-alantóidea e estabelecidos dois grupos experimentais: controle e infectado. A infecção foi procedida com a amostra de referência *B. abortus* 2308 ($1,0 \times 10^7$ UFCs) por quatro horas para avaliação do perfil de expressão gênica e por seis e 12 horas para avaliação da expressão de citocinas e quimiocinas na célula trofoblástica. Adicionalmente, foram utilizadas nesse estudo amostras de placentomas de vacas experimentalmente infectadas. Os resultados de microrranjo demonstraram que, após quatro horas de infecção, ocorreu uma supressão na expressão de genes associados a resposta inflamatória em células trofoblásticas nos explante de placenta bovina. A infecção dos explantes resultou na elevação significativa da expressão dos mediadores da resposta inflamatória, GCP-2 e IL-8, às 12 horas, mas não às seis horas após a infecção. No placentomo das vacas experimentalmente infectadas foi observada elevação na expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias tanto em animais com gestação a termo quanto em animais que abortaram. A resposta pró-inflamatória dos trofoblastos durante a infecção por *B. abortus*, não foi observada nos estágios iniciais da infecção, porém, mais tardiamente, a expressão de quimiocinas por células trofoblásticas e placentomas pode ter papel importante no desencadeamento do processo inflamatório da placenta e, conseqüentemente, aborto.

Palavras chave: *Brucella abortus*, bovino, placenta

ABSTRACT

Bovine brucellosis, caused by the *Brucella abortus*, is very important as a cause of abortion particularly at the end of gestation. The study of the interaction between *B. abortus* and trophoblastic cells is essential for a better understanding the pathogenesis of the *Brucella*-induced placentitis. The goal of this study was to evaluate the profile of gene expression in the bovine placenta during the infection with *B. abortus* by using explants of chorioallantoic membrane as an alternative method for the *ex vivo* study of the pathogenesis of bovine brucellosis. The explants were inoculated with *B. abortus* strain 2308 (1.0×10^7 CFU) for four hours to assess the trophoblastic gene expression profile during infection. Cytokines and chemokines expression in trophoblastic cells was assessed at six and 12 hours post infection. In addition, placentomes from experimentally infected cows were used in this study. Microarray and real time RT-PCR were used for evaluation of gene expression in trophoblastic cell. The microarray data demonstrated a suppression in the profile of pro-inflammatory gene expression in chorioallantoic membrane explants at four hours post infection. Infection of the explants with *B. abortus* resulted in a significant upregulation of pro-inflammatory genes, namely GCP-2 and IL-8, at 12, but not at 6 hours after inoculation. Placentomes of experimentally infected cows had an upregulation of these chemokines (GCP-2 and IL-8). The association of the explant model with methods for assessment of gene expression proved to be useful for studying host-pathogen interactions. A pro-inflammatory gene expression response was not observed in the early stages of infection of bovine trophoblastic cells with *B. abortus*. However, these data indicated a trophoblastic pro-inflammatory gene expression response at later time-points, which may play a role in eliciting neutrophil influx. This trophoblastic response is likely to contribute to the pathogenesis of placentitis, and consequently abortion.

Key-words:

INTRODUÇÃO

A Brucelose é uma doença infecciosa importante que acomete várias espécies de animais e o homem, causada por bactérias do gênero *Brucella*. Embora tenha sido controlada em alguns países do hemisfério norte (Godfroid e Kasbohrer, 2002), a brucelose ainda é uma zoonose de ampla distribuição mundial, endêmica em muitos países (Trujillo et al., 1994), resultando em prejuízos econômicos aos sistemas de produção, além de suas implicações em saúde pública devido a seu caráter zoonótico. No Brasil, dados oficiais indicam que a prevalência da brucelose bovina varia em torno de 4 a 5%, resultando em perdas da ordem de 32 milhões de dólares anuais para a pecuária do país (Poester et al., 2002). Medidas de controle e erradicação da doença tem sido prioridade para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) devido aos prejuízos acarretados e ao risco potencial à saúde pública.

A principal espécie do gênero *Brucella* que infecta bovinos é a *Brucella abortus*, que tem tropismo por tecidos placentários, causando aborto, principalmente no terço final de gestação (Anderson et al., 1986a). A infecção por *B. abortus* também resulta em redução na fertilidade e produção de leite (Gorham et al., 1986). As principais fontes de infecção para os bovinos são fetos abortados, anexos fetais e secreções uterinas contaminadas, que são eliminadas após aborto ou no período pós-parto. A entrada de *B. abortus* no organismo do hospedeiro ocorre preferencialmente por via oral (Ackermann et al., 1988). Os linfonodos regionais alojam inicialmente *B. abortus*, onde ocorre multiplicação e posterior disseminação para vários outros tecidos, especialmente o útero gestante, a glândula mamária e órgãos reprodutivos masculinos (Ko e Splitter, 2003). No útero gestante das fêmeas bovinas, *B. abortus* tem tropismo por células trofoblásticas. Sua multiplicação nos tecidos placentários resulta em placentite necrótica associada a intenso infiltrado neutrofílico, morte fetal e aborto (Anderson et al., 1986a). A infecção persiste em aproximadamente 80% das vacas infectadas e fica confinada em macrófagos da glândula mamária e linfonodos mamários por toda vida do

animal (Manthei e Carter, 1950; Córner et al., 1987).

A capacidade de infecção de fagócitos e células não fagocíticas *in vivo* e *in vitro* é uma característica de *B. abortus* (Detilleux et al., 1990a,b; Pizarro-Cerdá et al., 1998 e 2000). Após ser internalizada por fagócitos, a bactéria pode ser destruída no interior de fagolisossomos ou sobreviver nestes compartimentos e multiplicar-se em sítios intracelulares de multiplicação. A condição de opsonização de *B. abortus* no momento da internalização a torna mais susceptível a ação bactericida dos macrófagos, nesse caso, a maioria das bactérias internalizadas é destruída no interior de fagolisossomos antes de atingir os sítios de multiplicação intracelulares (Campbell et al., 1994; Gorvel e Moreno, 2002). Amostras virulentas de *B. abortus* alteram os mecanismos de maturação dos fagossomos, bloqueiam sua fusão com os lisossomos, impedindo assim a degradação bacteriana no interior do fagócito (Detilleux et al., 1990a,b; Pizarro-Cerdá, et al., 1998 e 2000, Gorvel e Moreno, 2002). Nos estágios iniciais da infecção, *B. abortus* pode ser encontrada no interior de vacúolos com características semelhantes a autofagossomos. No interior desses compartimentos intracelulares as formas virulentas transitam em direção às cisternas do retículo endoplasmático rugoso, local de intensa multiplicação bacteriana (Anderson et al., 1986b; Pizarro-Cerdá et al., 1998, Arenas et al., 2000). Desta forma, *B. abortus* multiplica-se intensamente dentro da célula sem alterar suas funções básicas com a capacidade de persistir por período prolongado, muitas vezes de forma silenciosa, sem desencadear resposta imune inata ou adquirida efetora no hospedeiro (Golding, 2001; Gorvel e Moreno, 2002).

Um aspecto importante na patogênese de *B. abortus* é a invasão das células do trofoblasto levando a placentite necrótica associada a abundante infiltrado neutrofílico (Detilleux et al., 1990). Na placenta, *B. abortus* multiplica-se intensamente no meio intracelular das células do epitélio trofoblástico (Anderson et al., 1986ab; Meador et al., 1989). A afinidade das bactérias pelo trofoblasto aparentemente está relacionada à concentração elevada de eritritol e progesterona na placenta. *B. abortus* é um dos poucos

organismos que têm capacidade de utilizar o eritritol como fonte de carbono e energia (Williams et al., 1962; Samartino & Enright, 1993). Tanto o eritritol quanto a progesterona favorecem o crescimento *in vitro* de *B. abortus* (Anderson et al., 1986). Samartino & Enright (1996) demonstraram que *B. abortus* cresce preferencialmente no trofoblasto em final de gestação (180 a 240 dias). Células trofoblásticas do início da gestação (60 a 120 dias) praticamente não permitem o crescimento intracelular da bactéria. Estes dados correlacionam bem com a manifestação clínica da infecção, ou seja, aborto preferencialmente no terço final da gestação. Estudos prévios demonstraram que, em animais gestantes, *B. abortus* replica-se preferencialmente nas células trofoblásticas das regiões intercotiledonárias da placenta (Anderson et al., 1986a,b). Contudo, ainda não são estabelecidos os mecanismos de desenvolvimento das lesões inflamatórias observadas durante o curso da infecção. O conhecimento dessa interação entre *B. abortus* e as células do epitélio trofoblástico é de fundamental importância para a compreensão da patogênese da infecção que determina a ocorrência do aborto.

Cabe ressaltar que a maior parte dos estudos sobre a patogênese da *B. abortus* têm utilizado

células fagocíticas ou linhagens celulares epiteliais pouco diferenciadas. Estudos sobre a interação entre a *B. abortus* e células trofoblásticas são muito escassos, devido a falta de linhagens celulares bovinas de origem trofoblástica. Contudo, o conhecimento da resposta do trofoblasto à infecção é importante, uma vez que, a interação de *B. abortus* com estas células alvo provavelmente desempenha papel fundamental na patogênese da placentite que ocorre nos casos de brucelose bovina. Neste estudo foi associado o cultivo *ex vivo* de células trofoblásticas em explantes da membrana corioalantóidea com métodos de análise de expressão gênica, como a tecnologia de microarranjo e RT-PCR quantitativo em tempo real. Portanto, considerando a hipótese de que a interação de células trofoblásticas com *B. abortus* resulta em alteração no perfil de expressão gênica, estimulando o processo inflamatório na placenta, os seguintes objetivos foram propostos para o presente estudo: (i) avaliar um modelo de estudo da patogênese da placentite e do aborto através de explantes da membrana corioalantóidea; (ii) verificar a existência de diferenças na expressão gênica no trofoblasto infectado por *B. abortus* em relação ao trofoblasto não-infectado; (iii) estabelecer o perfil de expressão de citocinas e quimiocinas no trofoblasto e no placentomo bovino durante a infecção por *Brucella abortus*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

Brucelose

A Brucelose é causada por bactérias do gênero *Brucella*, que são cocobacilos gram negativos, intracelulares facultativos, pertencentes à família $\alpha 2$ -proteobacteriacea (Ugald, 1999; Ko & Splitter, 2003). Embora um estudo baseado em hibridização tenha indicado que o gênero *Brucella* teria uma única espécie, com diferentes biotipos (Verger et al., 1985), atualmente ainda são reconhecidas seis espécies: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. Mesmo apresentando algumas diferenças entre suas características bioquímicas como a presença da cadeia O do lipopolissacarídeo LPS, entre outras, o genoma da *Brucella* é constituído de dois cromossomos circulares sem plasmídeo, com cerca de 94% de similaridade genética entre os membros do gênero (Verger et al., 1987; Del Vecchio et al., 2002a). O sequenciamento de várias espécies de *Brucella*, incluindo-se *B. melitensis* (Delvecchio et al., 2002b), *B. suis* (Paulsen et al., 2002), duas cepas de *B. abortus* (Halling et al., 2004; Chain et al., 2005) e *B. ovis* (I. Paulsen, R.L. Santos, R.M. Tsolis, et al., dados não publicados), demonstra que a variação genética no gênero *Brucella* é extremamente pequena, sendo observadas variações mais intensas até mesmo entre sorotipos de uma mesma espécie de bactéria, como no caso da *Salmonella enterica* (Tsolis, 2002). O elevado grau de similaridade genética entre as espécies do gênero *Brucella* foi também confirmada por hibridização de todo o genoma (Rajashékara et al., 2004), sendo que todos estes estudos dão suporte à proposição de que o gênero *Brucella* é de fato mono-específico (Verger et al., 1985). Isso pode explicar o fato de que, embora cada espécie demonstre maior preferência por hospedeiros mamíferos específicos, a maioria das espécies de *Brucella* é capaz de infectar outros hospedeiros (Boschioli et al., 2001). Com exceção de *B. ovis* e *B. neotomae*, todas as espécies podem infectar o homem, com diferentes graus de patogenicidade para o mesmo (Hartigan, 1997). Além destas seis espécies clássicas de *Brucella*, organismos deste gênero têm sido isolados de mamíferos marinhos. Embora a classificação dos isolados

marinhos ainda seja passível de debate, estes isolados foram inicialmente classificados em uma nova espécie nomeada *B. maris* (Jahans et al., 1997). Contudo, mais recentemente foi proposta a divisão destes isolados em duas espécies, *B. pinnipediae* e *B. cetaceae*, com base em seus hospedeiros (Cloeckert et al., 2001). Os isolados marinhos de *Brucella* têm potencial para causar infecção humana, com um relato de infecção devido a exposição laboratorial (Brew et al., 1999) e dois casos de infecção natural com manifestação neurológica (Sohn et al., 2003).

Considerada a zoonose mais difundida no mundo (Gil e Samartino, 2000), a brucelose está presente principalmente em países em desenvolvimento (Trujillo et al., 1994), além da região mediterrânea na Europa (Godfroid e Käsbohrer, 2002). Em algumas regiões endêmicas, como em partes da África, Oriente Médio e América Latina, a brucelose causa considerável morbidade humana constituindo-se em sério problema de saúde pública (Boschioli et al., 2001). Os sintomas mais comumente observados na brucelose humana são febre, anorexia, poliartrites, meningite, pneumonia e endocardites, além de eventuais manifestações clínicas menos comuns (Saure e Villissova, 2002; Santos et al., 2005). A transmissão da doença para o homem se dá principalmente pelo consumo de leite e derivados não pasteurizados; pelo contato direto com animais, fetos abortados e secreções uterinas, ou ainda carcaças de animais portadores durante procedimentos de abate (Young, 1983; Corbel, 1997). Em menor frequência a transmissão pode ocorrer acidentalmente através de amostras vacinais ou manipulação laboratorial da bactéria (Santos et al., 2005). Diante da natureza eminentemente zoonótica de transmissão da doença, fica clara a importância da prevenção da infecção em animais domésticos como um fator relevante na erradicação da brucelose e controle da infecção no homem.

Brucelose bovina

Em bovinos, a brucelose é geralmente causada pela *B. abortus* e, embora já tenham sido identificados nove biotipos, o biótipo 1 de *B. abortus* é o mais frequentemente isolado em

bovinos (Nicoletti, 1980). Como as espécies clássicas do gênero *Brucella* (*B. melitens*, *B. abortus* e *B. suis*), *B. abortus* apresenta morfologia lisa de sua colônia, conferida pela cadeia O do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular (Bundle et al., 1987; Lage et al., 2005). A cadeia O é um importante fator de patogenicidade, sendo a sua integridade bioquímica determinante dos sinais clínicos apresentados ou da ocorrência de doença, o que permite a utilização deste componente estrutural como estratégia no desenvolvimento de vacinas (Lage et al., 2005). Outra espécie com potencial infectante para bovinos é a *B. suis*, particularmente os biovars 1 e 3, que, embora não determinem transtornos reprodutivos como *B. abortus* (Ewalt et al., 1997), podem comprometer programas de erradicação da brucelose, devido aos anticorpos produzidos durante a infecção, reconhecidos nos testes sorológicos de forma equivalente a infecção por *B. abortus* (Rogers et al., 1989).

Surtos de brucelose bovina estão associados a ocorrência de abortos no terço final de gestação, nascimento de bezerros fracos e redução de fertilidade ou mesmo infertilidade de machos e fêmeas (Enright et al., 1984; Ficht, 2003; Poester et al., 2005). Portanto, a brucelose deve ser diferenciada por métodos de diagnóstico laboratoriais de outras doenças que cursam com aborto. A infecção, o estabelecimento da doença e a manifestação clínica da brucelose bovina são dependentes da idade, período reprodutivo do animal, estado imunológico, resistência natural, via de infecção, dose infectante e virulência da amostra presente no rebanho (Nicoletti, 1980; Adams, 2002; Paixão, 2006).

A infecção de bovinos por *B. abortus* resulta em quadro clínico evidente em fêmeas adultas gestantes, caracterizado por aborto no último trimestre de gestação (Samartino e Enright, 1992). Após o aborto, as fêmeas podem permanecer sem manifestação clínica da doença até uma nova gestação, ou ainda, não apresentar abortos em gestações subseqüentes (Wilesmith, 1978). Os bezerros e novilhas que eventualmente adquirem a infecção por via transplacentária ou pela ingestão de leite, podem ser sorologicamente negativos e não manifestarem a doença até a vida adulta. Porém, as novilhas com infecção latente podem manifestar aborto ou ter bezerro infectado, sendo estes animais

importantes na manutenção da doença no rebanho (Nicoletti, 1980). Outros sinais clínicos observados em fêmeas bovinas infectadas por *B. abortus* incluem a redução na produção de leite, aumento na contagem de células somáticas do leite, aumento do intervalo entre partos após o aborto ou em função da metrite pós-parto, com conseqüente redução da fertilidade (Gorham et al., 1986; Meador e Deyoe, 1989). Em machos, o início da infecção caracteriza-se por sinais sistêmicos como febre, anorexia e depressão, geralmente inaparentes (Campero et al., 1990). A alteração mais comumente observada no macho é a orquite (Lambert et al., 1963; Trichard et al., 1982), podendo estar associada a vesiculite seminal e epididimite (Rankin, 1965; Mc Caughey e Purcell, 1973). A orquite em touros pode evoluir para lesões irreversíveis que podem determinar infertilidade permanente no animal (Campero et al., 1990).

As principais fontes de infecção de *B. abortus* são fetos abortados, anexos fetais e secreções uterinas contaminadas, que são eliminadas após aborto ou no período pós-parto (Samartino e Enright, 1993). Deve ser feita referência também a transmissão transplacentária descrita por Ray et al. (1988) e a transmissão através da ingestão do leite por bezerros, importantes causas de manutenção da doença no rebanho (Ficht, 2003). Apesar do risco de transmissão da infecção pela monta natural ser baixo, é necessário cuidado com o sêmen utilizado em inseminações artificiais, pois o sêmen contaminado atua como potencial fonte de transmissão da brucelose bovina (Rankin, 1965).

Embora a *B. abortus* possa utilizar como porta de entrada a pele, conjuntiva ou mucosa respiratória por inalação (Ko & Splitter, 2003), a via mais comum de infecção de bovinos é o trato gastrointestinal (Payne, 1959). Após a infecção oral, as bactérias são endocitadas pelas células epiteliais do intestino delgado, principalmente as células M das placas de Peyer (Ackermann et al., 1988), de onde migram para os linfonodos regionais, se alojam e proliferam no interior de fagócitos, os macrófagos e neutrófilos (Anderson et al., 1986a). A invasão dos vasos linfáticos é seguida da bacteremia possibilitando a infecção por todo o organismo e a colonização de vários tecidos, especialmente o útero gestante, órgãos genitais masculinos e glândula mamária (Ko e Splitter, 2003).

Em vacas gestantes a infecção uterina assume maior importância pela freqüente ocorrência de aborto no terço final da gestação. O aborto se dá em função do tropismo de *B. abortus* para a placenta, afinidade esta descrita em ruminantes e que está relacionada com elevadas concentrações de eritritol e hormônios esteróides neste período gestacional na placenta bovina. O eritritol atua como agente facilitador da sobrevivência bacteriana servindo de fonte de carbono e energia para *B. abortus* (Samartino e Enright, 1996). As células trofoblásticas eritrofagocíticas, localizadas na base das vilosidades coriônicas (Santos et al., 1996), atuam como porta de entrada de *B. abortus* para placenta, com posterior extensão da infecção para os trofoblastos intercotiledonários (Anderson et al., 1986). Em infecções experimentais de cabras gestantes, observou-se que no interior da célula trofoblástica a bactéria se localiza e replica nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Anderson et al., 1986a). A multiplicação bacteriana induz a infiltração de células inflamatórias, com necrose do epitélio trofoblástico, vasculite e ulceração da membrana córion-alantóideia. Além da disseminação bacteriana para as vilosidades coriônicas e tecidos fetais, a placentite necrótica altera as trocas metabólicas materno-fetais devido a separação dos componentes materno e fetal da placenta, resultando no aborto (Anderson et al., 1986a).

As lesões observadas na vaca gestante e no feto abortado são indicativas da infecção por *B. abortus*, no entanto, lesões semelhantes são vistas em outras infecções bacterianas, em maior ou menor intensidade e, por isso, não são conclusivas no diagnóstico macroscópico da brucelose. Embora exista evidente variação individual na manifestação das lesões (Payne, 1959), de forma geral, a vaca gestante apresenta aumento de volume e hiperplasia dos linfonodos localizados próximos ao ponto de entrada do agente como reação imediata à infecção, o que eventualmente evolui para linfadenite regional aguda (Kennedy e Miller, 1993). No útero gestante pode ser observada quantidade variável de exsudato fétido amarelo-amarronzado, floculento, contendo material necrótico (Silva et al., 2005; Paixão, 2006). É importante destacar como característica da infecção da placenta, a aleatoriedade de distribuição da lesão nas

estruturas placentárias, ou seja, aparente normalidade de alguns placentomas enquanto outros se apresentam necróticos e/ou hemorrágicos, com exsudato amarronzado de odor fétido contendo grande quantidade de colônias bacterianas (Payne, 1959; Paixão, 2006). A variação na severidade das lesões placentárias é que determina a ocorrência de aborto nos casos mais severos ou o nascimento de animais prematuros ou a termo em lesões menos severas (Kennedy e Miller, 1993).

As alterações microscópicas demonstram mais claramente o processo inflamatório causado pela infecção na vaca gestante. A hiperplasia dos folículos linfóides, que inicialmente ocorre nos linfonodos, é seguida de infiltração de neutrófilos e de áreas de hemorragia, resultando em linfadenite multifocal que evolui, com a cronicidade, para um processo inflamatório granulomatoso (Payne, 1959; Meador et al., 1988; Meador et al., 1989b). Da mesma forma todo tecido uterino sofre intensa infiltração de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e alguns eosinófilos caracterizando assim uma endometrite mista difusa. Estas células inflamatórias também podem ser observadas junto a produtos de secreção uterina no interior luminal das glândulas endometriais distendidas. O epitélio endometrial necrótico, a partir de erosões primárias, desenvolve pequenas úlceras recobertas por restos celulares e grande quantidade de bactérias (Payne, 1959; Meador et al., 1988). O lúmen endometrial, assim como a superfície caruncular também necrótica, apresenta em suas criptas intenso exsudato caracterizado por infiltrado neutrofilico associado a bactérias intra e extra-celulares (Paixão, 2006). Na placenta, as células trofoblásticas, que são o principal alvo da infecção por *B. abortus*, apresentam-se distendidas e repletas de cocobacilos. Associada a presença da bactéria, observa-se infiltrado inflamatório de macrófagos e neutrófilos, edema, necrose, acúmulo de fibrina e em alguns casos vasculite. Algumas semanas após o aborto o processo inflamatório regride restringindo-se apenas à região periglandular e perivascular (Meador et al., 1988). Outro importante órgão alvo da infecção por *B. abortus* é a glândula mamária, o que é extremamente importante devido ao potencial de transmissão da infecção pelo leite. A glândula mamária pode apresentar mastite intersticial multifocal ou difusa discreta

com a presença de macrófagos e neutrófilos no lúmen glandular (Emminger e Schalm, 1943; Payne, 1959; Meador et al., 1989; Paixão, 2006).

Em condições naturais, dificilmente é possível se fazer a avaliação macroscópica do feto abortado devido ao estado avançado de autólise. No entanto, descrições de infecções experimentais com *B. abortus* permitem a constatação de que mesmo imediatamente após o aborto os fetos podem estar autolizados e edematosos, contendo líquido avermelhado no tecido subcutâneo e nas cavidades corporais. Os órgãos abdominais podem estar recobertos por fibrina e os linfonodos aumentados de volume, com espessamento da cortical e com edema, principalmente nos linfonodos ilíacos internos, bronquiais e pré-hepáticos (Enright et al., 1984; Gorham, et al., 1986). Embora não seja observada em todos os casos, a pleuropneumonia é a lesão mais frequentemente encontrada em fetos abortados por infecção de *B. abortus* (Lopez et al., 1984; Paixão, 2006). Macroscopicamente, a pleura encontra-se espessa, de coloração esbranquiçada, com os vasos linfáticos proeminentes e circunscritos por edema (Gorham, et al., 1986), podendo ainda haver hemorragia ou deposição de fibrina na superfície pleural caracterizando pleurite fibrinosa (Paixão, 2006). Os pulmões, quando alterados, apresentam aumento de volume, áreas focais a difusas de coloração cinza, firmes à palpação com espessamento dos septos interlobulares (Paixão, 2006). Com frequência também pode ser observada pericardite fibrinosa (Paixão, 2006), ou seja, o feto abortado apresenta inflamação fibrinosa de diversas cavidades corporais, caracterizada por pleurite, pericardite e peritonite fibrinosas, em ordem decrescente de frequência (Paixão, 2006). Além destas lesões, podem ser observadas alterações de tamanho das adrenais, que se apresentam aumentadas, e no timo que pode estar reduzido de tamanho com áreas de hemorragias petequiais (Enright et al., 1984).

Histologicamente, a lesão pulmonar fetal é caracterizada como broncopneumonia ou pneumonia intersticial com intensa infiltração de macrófagos, áreas focais de infiltração neutrofílica e quantidade variável de fibrina, podendo ser observado em alguns casos arterite necrótica (Enright, et al., 1984; López et al., 1984; Meador et al., 1988). Contudo, a

frequência de lesões no parênquima pulmonar é menor do que a frequência de pleurite fibrinosa em fetos abortados de vacas experimentalmente inoculadas (Paixão, 2006). Os linfonodos e o baço apresentam hiperplasia linfóide, enquanto no timo ocorre depleção dos folículos linfóides (Enright et al., 1984). Em outros órgãos também são observadas alterações como processo inflamatório granulomatoso no fígado, baço e rim (Meador et al., 1988; Hong et al., 1991) ou envolvimento do sistema nervoso central, como em alguns casos descritos de meningite histiocitária multifocal ou difusa associada a vasculite em fetos abortados. Estas lesões podem ou não estar associadas à presença de *B. abortus* no tecido (Hong et al., 1991).

O diagnóstico clínico e epidemiológico da brucelose, baseado no histórico de ocorrência de abortos, nascimento de bezerros fracos e infertilidade de machos e fêmeas, tem um papel importante no estabelecimento da suspeita inicial da doença, que deve ser confirmada por métodos laboratoriais. As técnicas laboratoriais são ferramentas fundamentais no diagnóstico definitivo da brucelose bovina e para identificação do número de animais infectados em um rebanho. Os testes laboratoriais disponíveis são baseados em duas estratégias: os exames sorológicos e os exames diretos, considerados conclusivos para o diagnóstico da doença (Poester et al., 2005).

O diagnóstico direto compreende o isolamento e identificação do agente, através de provas bioquímicas, testes estes considerados de referência pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, em função de possibilitar a tipificação das amostras isoladas (Brasil, 2004). Porém, deve-se considerar a limitação na execução dos mesmos pela dependência de laboratório especializado com segurança biológica devido a classificação da *Brucella* sp. como microorganismo de manipulação em laboratório de nível 3 de biossegurança (Nielsen e Ewalt, 2004). Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) é possível a detecção de ácidos nucleicos do agente, que em algumas situações podem amplificar seqüências específicas de espécies ou biovariedades (Leal- Klevezas et al., 1995; Bricker, 2002). Da mesma forma, a técnica de imunistoquímica, que é utilizada para identificação direta e espacial do agente no

tecido, tem contribuído bastante em estudos de patogenia da brucelose (Meador et al., 1986; López et al., 1984; Santos et al., 1998) e como método auxiliar de diagnóstico (Poester et al., 2005).

Os exames indiretos ou sorológicos, determinados pela identificação de imunoglobulinas (Ig) produzidas pelo hospedeiro, utilizam-se de uma característica importante da superfície celular de bactérias Gram-negativas, a molécula de lipopolissacarídeo (LPS) (Nielsen, 2002). No caso de *B. abortus* e outras espécies do gênero com morfologia lisa, a presença do polissacarídeo O na molécula de LPS induz, no hospedeiro, resposta humoral de produção inicial de IgM imediatamente seguida pela produção de IgG1 e mais tardiamente pequenas quantidades de IgG2 e IgA (Beh, 1974; Allan et al., 1976; Nielsen et al., 1984). Os testes de diagnóstico com habilidade para mensurar IgM podem resultar em reações cruzadas, em função de reações resultantes da exposição à outros agentes. Desta forma, considerando a baixa especificidade de IgM e a presença tardia e em pequenas quantidades de IgG2 e IgA, a principal classe de imunoglobulinas pesquisada em testes de diagnóstico sorológicos é a IgG1 (Allan et al., 1976; Lamb et al., 1979; Nielsen et al., 1984; Butler et al., 1986).

As provas sorológicas utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina são divididas em provas de triagem, como os testes de aglutinação com antígeno acidificado tamponado e o teste do anel em leite, ambos com elevada sensibilidade, permitindo a redução de detecção de animais falsos negativos; e provas complementares ou confirmatórias que visam eliminar os efeitos da reação com IgM pela detecção de IgG, marcador de infecção ativa (Brasil, 2004). A prova confirmatória preconizada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose é o teste de redução pelo 2-mercaptoetanol, no entanto também são aplicados para fins de confirmação os testes de fixação do complemento, testes imunoenzimáticos como ELISA convencional, ELISA indireto, ELISA competitivo e o ensaio de polarização fluorescente (Nielsen, 2002; Poester et al., 2005).

O diagnóstico sorológico pode ser comprometido pelo uso de vacinas como a B19 que induz no hospedeiro uma resposta sorologicamente indistinta da infecção causada por amostras virulentas (Lage et al., 2005). Por outro lado, a vacina foi um importante avanço para os programas de controle e erradicação da brucelose e a partir dela as técnicas de diagnóstico tem se aprimorado. Da mesma forma, vacinas que buscam eliminar esse problema têm sido testadas e aprovadas, como a vacina RB51 com elevada eficácia contra *B. abortus* virulenta, sem interferência sobre os testes sorológicos utilizados na rotina diagnóstica dos programas de controle (Shurig et al., 1991; Cheville et al., 1993; Poester et al., 2006).

Invasão das células do hospedeiro por *Brucella abortus*

Um aspecto importante na patogênese de *B. abortus* que a caracteriza como uma bactéria patogênica intracelular é sua habilidade de aderência e invasão de fagócitos e células não fagocíticas, além da capacidade de estabelecimento e replicação no interior das células hospedeiras. Após invasão pela mucosa intestinal, *B. abortus* pode ser fagocitada por células M, assim como por neutrófilos e macrófagos intraepiteliais que auxiliam no transporte transepitelial de *B. abortus* para a lâmina própria e submucosa (Ackerman et al., 1988). Nestes fagócitos as bactérias opsonizadas são internalizadas via complemento e receptores de FC, enquanto as não opsonizadas aparentemente penetram via receptores de lectina e fibronectina (Campbell et al., 1994). Essa característica é relevante devido à observação de que bactérias opsonizadas fagocitadas por macrófagos ativados são mais facilmente destruídas no interior de fagolisossomos antes de atingir os sítios de replicação intracelulares, quando comparadas àquelas que utilizaram outros meios de invasão, determinando assim uma ligação da forma de internalização com a sobrevivência intracelular de *B. abortus* (Gorvel e Moreno, 2002). Por outro lado, a virulência da amostra de *Brucella* não tem qualquer influência sobre a aderência e invasão da mesma na célula hospedeira, ou seja, assim como amostras virulentas, amostras apatogênicas conseguem aderir e se interiorizar embora não completem o tráfego intracelular até os sítios de multiplicação

(Pizarro-Cerdá et al., 2000; Gorvel e Moreno, 2002).

Em fagócitos não profissionais, ou seja, células originalmente não fagocíticas que são permissivas à infecção por *B. abortus*, mesmo não sendo identificados receptores celulares ou ligantes bacterianos que auxiliam na sua invasão, existem evidências da participação de moléculas específicas de ligação de *B. abortus* a estas células (Gorvel e Moreno, 2002). Estudos *in vitro*, utilizando linhagens celulares de mamíferos que mimetizam a infecção natural de células epiteliais bovinas como os trofoblastos, demonstraram que *B. abortus* para invadir estas células, realiza recrutamento de filamentos de actina, no sítio de ligação da bactéria à membrana plasmática da célula hospedeira (Pizarro-Cerdá et al., 1999). A participação do citoesqueleto de actina já havia sido observada em microscopia eletrônica, associada à evidência da participação dos microtúbulos no processo (Guzman-Verri et al., 2001). A internalização de *B. abortus* em células não fagocíticas envolve, além da mobilização de estruturas do citoesqueleto, a ativação de algumas GTPases da subfamília Rho como: Rho, RAC e Cdc42 (Guzman-Verri et al., 2001). Estas GTPases são conhecidas como reguladoras do citoesqueleto e participam da internalização de várias bactérias intracelulares. A interação destas moléculas com *B. abortus* auxiliam na modulação de sua invasão na célula hospedeira. A principal GTPase diretamente ativada ao contato de *B. abortus* com a célula hospedeira é Cdc42. Embora a *Brucella* sp. não ative diretamente RAC e Rho, a propriedade destas proteínas de facilitar a interação de microtúbulos e filamentos de actina é utilizada como estratégia de invasão pelas *Brucella* (Waterman-Storer et al., 1999). Outros mediadores moleculares que também estão envolvidos no processo de infecção e internalização de *B. abortus* são os mediadores de energia metabólica, de endocitose e acidificação endossomal, GMP cíclico e outras Kinases celulares como PIP 3- kinase, tirosina - kinase, MAP- kinases, produzidas pela maquinaria celular durante estes eventos (Guzman Verri et al., 2001; Gorvel e Moreno, 2002).

Sobrevivência intracelular de *Brucella abortus*

Os principais determinantes da sobrevivência intracelular de *B. abortus* são os mecanismos de resistência ao ambiente acidificado intracelular e a inibição da fusão do fagossomo ao lisossomo (Pizarro-Cerdá, 1998a; Porte, et al., 1999; Wang et al., 2001). Estes processos são desencadeados a partir da internalização de *B. abortus* que redireciona o tráfego intracelular, altera a dinâmica normal de maturação dos fagossomos e bloqueia sua fusão com os endossomos e lisossomos, impedindo assim a degradação bacteriana para garantir sua sobrevivência (Gorvel e Moreno, 2002). Embora este tráfego não seja homogêneo em todas as células, como por exemplo, nos neutrófilos que não permitem multiplicação bacteriana, de forma geral, os eventos ocorridos durante o trânsito de *B. abortus* em fagócitos profissionais (monócitos e macrófagos) é semelhante ao descrito em fagócitos não profissionais (células HeLa, Vero, fibroblastos e trofoblastos) (Jiang et al., 1993, Gorvel e Moreno, 2002).

Na fase inicial de internalização deve-se destacar a formação do complexo lisossomal precoce/inicial como evento fundamental para subsequente tráfego normal de *B. abortus* em células hospedeiras. A interação bacteriana com esse compartimento resulta na expressão de proteínas como Rab 5 e antígeno endossomal precoce /inicial (EEA1) (Pizarro-Cerdá et al., 1998b, Chaves-Olarte et al., 2002). A ativação de GTPases diferentes das observadas no momento da invasão e internalização também são requeridas para o tráfego intracelular de *B. abortus* o que demonstra a independência dos eventos moleculares (Pizarro-Cerdá, 1998a,b; Guzmán-Verri et al., 2001; Gorvel e Moreno, 2002). Outro aspecto importante no trânsito de *B. abortus*, necessário nos momentos iniciais após a infecção, é a acidificação vacuolar ocorrida em macrófagos, esta modificação do ambiente intravacuolar resulta na ativação de genes de virulência bacteriana (Porte et al., 1999).

Em cultivos de células HeLa, duas horas após a inoculação, *B. abortus* se localiza em compartimentos intracelulares multimembranosos, onde é encontrada a proteína lisossomal associada a membrana (LAMP1), uma glicoproteína que permite a identificação deste compartimento como estrutura semelhante a um

autofagossomo (Pizarro-Cerdá et al., 1998b, Pizarro-Cerdá et al., 2000). Também são identificados, nesta etapa do tráfego intracelular, marcadores moleculares do retículo endoplasmático como a calreticulina e sec61 β que permitem a constatação do percurso realizado pela amostra virulenta de *B. abortus* no interior do autofagossomo (Pizarro-Cerdá et al., 1998b), em direção ao retículo endoplasmático das células hospedeiras, onde estabelecem o nicho favorável à intensa replicação bacteriana (Anderson et al., 1986b; Pizarro-Cerdá et al., 2000). Apesar da *Brucella* sp. conseguir realizar replicação limitada em algumas estruturas inicialmente envolvidas no tráfego intracelular, nenhum destes ambientes sustentam a replicação como o retículo endoplasmático (Comerci et al., 2001; Chaves Olarte et al., 2002; Gorvel e Moreno, 2002).

A importância do retículo endoplasmático como sítio de replicação de *B. abortus*, já havia sido demonstrada ultraestruturalmente em trofoblastos e linhagens celulares de mamíferos (Anderson et al., 1986b; Detileux et al., 1990a). No entanto, uma característica importante da patogênese de *B. abortus* observada em células trofoblásticas *in vivo* é a replicação bacteriana preferencial nos estágios médio e final de gestação, quando estas células secretam ativamente hormônios esteróides (Enright e Samartino, 1994). No interior de trofoblastos, a *B. abortus* induz a síntese de esteróides e modifica o metabolismo dos precursores da prostaglandina, utilizando-se destes hormônios como fatores de crescimento bacteriano (Anderson et al., 1986). Adicionalmente, observam-se alterações hormonais na placenta infectada, com elevação dos níveis de prostaglandina F2 α , redução dos níveis de progesterona e aumento da síntese de estrógenos e cortisol, bastante semelhantes às modificações ocorridas no momento do parto (Enright e Samartino, 1994; Gorvel e Moreno, 2002). Essas modificações do perfil hormonal associadas a afinidade e intensa replicação de *B. abortus* na célula trofoblástica contribuem para a ocorrência de aborto, principal consequência da infecção por *B. abortus* em vacas gestantes.

Determinantes moleculares de virulência envolvidos na patogênese de *Brucella abortus*

Ao contrário de outras bactérias patogênicas, nenhum fator de virulência clássico como: exotoxinas, citolisinas, cápsula, fímbria, flagelo, plasmídios, fagos lisogênicos, formas resistentes, variação antigênica, lipopolissacarídeo (LPS) endotóxico ou indutores apoptóticos têm sido descritos em organismos do gênero *Brucella* (Moreno e Moriyón, 2001). Os verdadeiros elementos de virulência da *Brucella* sp. são determinantes moleculares de invasão (Guzman-Verri et al., 2001) e resistência intracelular (Moreno e Moriyón, 2001) que permitem ao microorganismo chegar ao seu ambiente de multiplicação seja em fagócitos profissionais ou células não fagocíticas (Pizarro Cerda et al., 1998b; Pizarro Cerda et al., 1999; Detileux et al., 1990a,b). Dessa forma, alguns determinantes antigênicos se destacam em diferentes momentos da patogênese de *B. abortus*, estando envolvidos tanto no momento da invasão e internalização, quanto durante o trânsito intracelular.

A característica de maior habilidade de invasão de células hospedeiras observada em amostras de *Brucella* de morfologia lisa, sugere a participação da cadeia O do lipopolissacarídeo (LPS), presente nas formas lisas como um determinante molecular de virulência, embora ocasionalmente amostras rugosas sejam naturalmente virulentas (Sola-Landa et al., 1998; Ko e Splitter, 2003). A identificação do LPS da *Brucella* sp. como um determinante antigênico ou “fator de virulência” se deu pela observação inicial de reduzida imunogenicidade desta molécula e consequente deficiência de ativação da via alternativa do complemento (Sangari e Aguero, 1996). Além disso, observou-se a necessidade de dez vezes mais LPS de *Brucella* sp. para indução de elementos da resposta imune, em relação a endotoxinas produzidas por bactérias patogênicas como as enterobactérias (Keleti, 1974). Posteriormente, através de estudos com mutantes de *Brucella* sp. deficientes na cadeia O do LPS, constatou-se que a ausência desta molécula determinava a lise bacteriana mediada pelo sistema complemento (Allen et al., 1998). Deve-se ressaltar que o LPS tem um papel como determinante de virulência essencialmente no ambiente extracelular, ou seja, no momento da invasão da célula hospedeira (Ko e Splitter, 2003). Além do LPS, estudos recentes de

mapeamento genético têm revelado a existência de vários genes que podem atuar como “fatores de virulência” durante o evento de invasão bacteriana (Del Vecchio et al., 2002). Estes genes são potencialmente codificadores de adesinas, invasinas e genes semelhantes a *virG* um sistema regulatório presente no *Agrobacterium tumefaciens* e *Shigella* spp., composto de um sensor de histidina e um mediador de resposta adaptativa a uma variedade de processos celulares, entre eles, mecanismos relacionados a patogênese (Gao et al., 2006; West e Stock, 2001). Estes genes são expressos durante a ligação bacteriana e recrutamento de actina nas células hospedeiras (Sánchez et al., 2001; Del Vecchio et al., 2002).

Durante a internalização de *B. abortus*, tanto em células fagocíticas quanto em fagócitos não profissionais, são identificados genes reguladores de virulência relacionados a *Brucella* - *bvrS*-*bvrR*. Na ausência de fatores de virulência clássicos como observados em outros patógenos, a atuação desses genes como componentes estruturais encontrados tanto na membrana plasmática, como em domínios transmembrânicos de *B. abortus* é de fundamental importância na transmissão de sinal e regulação da transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas em processos de invasão e sobrevivência bacteriana na célula hospedeira (López-Goñi et al., 2002). O sistema regulatório de dois componentes observado em *bvrS*-*bvrR* é semelhante ao encontrado em outras bactérias como: *Mesorhizobium loti*, *Bartonella bacilliformis* e *Agrobacterium tumefaciens*, com a mesma função reguladora de virulência, porém ativados por estímulos diferentes (Sola-Landa et al., 1998; Guzmán-Verri et al., 2002; López-Goñi et al., 2002). As proteínas codificadas por estes genes são: BvrS, proteína sensorial membro da superfamília de proteínas histidina-quinase e BvrR, proteína reguladora. Após estímulo ambiental, BvrS sinaliza para BvrR que atua na regulação e controle da expressão de proteínas de membrana externa (Omps) essenciais no processos de invasão bacteriana (López-Goñi et al., 2002; Guzman-Verri et al., 2002). Amostras virulentas de *B. abortus* mutantes para o gene *bvrR* e, especialmente, *bvrS* perdem a habilidade de recrutar as GTPases da subfamília Rho, principalmente Cdc42, requerida para polimerização da actina e invasão da célula hospedeira. Adicionalmente, estas amostras

mutantes, quando estimuladas a invasão por tratamentos enzimáticos, apresentam maior fragilidade aos mecanismos microbicidas da célula hospedeira, pois são incapazes de inibir a fusão fagossomo-lisossomo, o que indica o envolvimento desse sistema *bvrS*/*bvrR* (BvrS-BvrR) não somente na invasão celular, mas também no controle da maturação vacuolar e tráfego intracelular (Sola-Landa et al., 1998; López-Goñi et al., 2002).

Para modulação do tráfego intracelular, *B. abortus* dispõe de mecanismos moleculares recentemente descobertos que atuam na regulação do transporte de amostras virulentas dos vacúolos semelhantes a autofagossomos para o retículo endoplasmático, onde ocorre replicação (Hong et al., 2000; Boschiroli et al., 2002; Ko e Splitter, 2003). Esses determinantes fazem parte de um grupo de genes ou operon *virB* codificadores do sistema de secreção tipo IV (Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001). O operon *virB*, composto de 12 genes *virB1* a *virB12*, foi descrito inicialmente em patógenos de plantas como o *Agrobacterium tumefaciens*, e posteriormente confirmado, por análises genômicas, como um conjunto de genes cuja atuação através do sistema de secreção tipo IV têm papel fundamental na virulência e multiplicação intracelular de *B. abortus* (O’Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000). A ação do sistema de secreção tipo IV na manutenção da sobrevivência intracelular de *B. abortus* já foi observada tanto em fagócitos profissionais, macrófagos, quanto em células não fagocíticas, como células HeLa (O’Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001). Embora não estejam completamente estabelecidos os mecanismos de ação deste sistema no controle do trânsito intracelular de *B. abortus* (Boschiroli et al. 2002), é sugerido o seu envolvimento na modulação da biogênese e maturação dos compartimentos vacuolares que transportam *B. abortus* até seu nicho de replicação (Delrue et al., 2001; Comerci et al., 2001; Boschiroli et al., 2002a), assim como sua participação na fusão do vacúolo semelhante a autofagossomo contendo *Brucella* com retículo o endoplasmático (Arellano-Reynoso et al., 2005). A infecção experimental de camundongos e cultivos celulares com amostras de *B. abortus* deficientes no sistema de secreção tipo IV confirma através da degradação bacteriana a

incapacidade, na ausência desse sistema, de fusão vacúolo-lisossomo e interação com o retículo endoplasmático (O'Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000; Sieira et al., 2000; Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001; Sun et al., 2002; Watarai et al., 2002; Celli et al., 2003; Den Hartigh et al., 2004; Kim et al., 2004; Sun et al., 2005). O sistema de secreção tipo IV parece não ter ação nos eventos iniciais de invasão e sobrevivência (Celli, 2006). Contudo, estudos demonstram seu importante papel no estabelecimento e manutenção da infecção persistente (Hong et al., 2000; Boschirolì et al., 2002; Celli, 2006).

O sequenciamento do genoma de várias espécies do gênero *Brucella* tem permitido o conhecimento de mecanismos envolvidos em patogênese (Sanchez et al., 2001; Del Vecchio et al., 2002; Pausen et al., 2002; Xiang et al., 2006; Halling et al., 2005) como: o sistema de secreção tipo IV, determinado pelo operon *virB* (O'Callaghan et al., 1999); o sistema regulatório de 2 componentes codificado pelos genes *bvrR* e *bvrS* (Sola-Landa et al., 1998), além de moléculas envolvidas na proteção de *B. abortus* contra explosão oxidativa durante a infecção de macrófagos (Gee et al., 2005). A manipulação do genoma da *Brucella*, a aplicação de técnicas de mutagênese e a utilização de transposons têm proporcionado a descoberta de outros novos determinantes moleculares de virulência distribuídos entre genes, açúcares e proteínas bacterianas, que determinarão importante avanço como ferramentas de estudo para o entendimento da patogênese da brucelose (Hong et al., 2000; Sánchez et al., 2001; Del Vecchio et al., 2002b).

Resposta imune do hospedeiro contra *Brucella abortus*

Após a infecção por *B. abortus*, vários são os mecanismos de resposta imune do hospedeiro bovino, relacionados tanto a imunidade inata quanto à adquirida. A resposta imune inata, caracterizada como não específica, desempenha papel relevante na infecção por *B. abortus*, pois atua na redução do número inicial de bactérias e prepara um ambiente adequado para geração da resposta imune adquirida (Golding et al., 2001; Ko e Splitter, 2003). Os principais componentes envolvidos na imunidade inata são as células fagocíticas: neutrófilos e, especialmente, macrófagos. No entanto, para ativação e

execução de suas funções microbicidas é necessário o reconhecimento de *B. abortus* pela superfície celular destes fagócitos. Os principais receptores responsáveis por esse reconhecimento são os receptores semelhantes a Toll (TLRs) (Weiss et al., 2005). Os TLRs são homólogos de uma proteína chamada Toll da *Drosophila melanogaster* (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Nesta espécie, tem a função de defesa antimicrobiana do hospedeiro (Kopp e Medzhitov, 1999). A descoberta dos receptores semelhantes à Toll em mamíferos possibilitou o entendimento das vias de reconhecimento bacteriano por macrófagos e células dendríticas (Medzhitov e Janeway, 1997). Como componentes da resposta imune inata, os TLRs são ativados em resposta a componentes conservados de microrganismos como: lipoproteínas bacterianas, flagelinas e LPS reconhecidos por TLR2, TLR5 e TLR4, respectivamente (Weiss et al., 2005). O LPS é o maior constituinte de membrana externa de *B. abortus* e seu reconhecimento é mediado por CD14, contudo CD14 forma complexos com moléculas de domínios transmembrânicos necessários para transdução de sinal, particularmente o TLR4. Experimentos envolvendo a mutação de TLR4 em camundongos posteriormente infectados por *B. abortus* demonstraram a importância desta molécula na indução de resposta inflamatória. Outros estudos sugerem ainda o envolvimento do TLR2 em associação com TLR4 no reconhecimento da *Brucella*, mesmo que através de outros componentes bacterianos. Além desses receptores, participam do reconhecimento e ativação de macrófagos, moléculas adaptadoras como o fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88). O MyD88 é um transdutor do sinal desencadeado pelos TLRs, que assumem papel determinante no desenvolvimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro à infecção por *B. abortus* (Weiss, et al., 2005). Embora o TLR4 seja o principal receptor de reconhecimento de LPS de bactérias Gram-negativas, a estrutura não clássica do LPS e a ausência de substâncias citotóxicas geradas por *B. abortus* determina diferenças no desenvolvimento de resposta inflamatória quando comparada a outras bactérias intracelulares Gram-negativas como *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Escherichia coli* (Ritting et al., 2003; Dueñas et al., 2004).

A explosão oxidativa e a utilização dos reativos intermediários de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) são mecanismos eficazes dos macrófagos para redução do número de bactérias intracelulares. Mecanismos são estimulados por citocinas da resposta imune inata, como o Interferon γ (IFN γ) e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) (Jones e Winter, 1992; Jiang et al., 1993). Estudos *in vitro* utilizando macrófagos murinos e posteriormente camundongos “knockout” comprovam o papel, particularmente, dos reativos intermediários de oxigênio no controle da sobrevivência intracelular de *B. abortus* durante a fase inicial da infecção (Jiang et al., 1993; Ko et al., 2002). Adicionalmente, macrófagos infectados possuem a característica de secretar interleucina 12 (IL-12), citocina que determina a diferenciação dos linfócitos T auxiliar CD4⁺ (Th0) na subpopulação Th1 com funções fundamentais na resposta imune adquirida contra *B. abortus* (Splitter et al., 1996; Oliveira et al., 2002).

A atividade citotóxica das células “natural killer” (NK) também compõe a resposta imune inata na infecção por *B. abortus*. Sua função bactericida já foi demonstrada *in vitro* em macrófagos humanos (Salmeron et al., 1992), podendo apresentar-se em bovinos como células de defesa direta contra *B. abortus*, ou ainda, como células secretoras de IFN γ (Golding et al., 1991), citocina que atua sobre macrófagos estimulando sua atividade bactericida (Oliveira et al., 2002; Wyckoff III, 2002). As proteínas plasmáticas que compõem o sistema complemento participam primariamente na resposta imune inata do hospedeiro infectado por *B. abortus*. Seus mecanismos de atuação são a opsonização e eliminação imediata da bactéria extracelular ou sua interação com bactérias neutralizadas por anticorpos (Corbeil et al., 1988).

Outro elemento relacionado à imunidade inata à brucelose em bovinos é a frequência de genótipos caracterizados como resistentes (Adams e Templeton, 1998). O fenótipo resistente a brucelose está relacionado à capacidade dos macrófagos inibirem o crescimento intracelular de *B. abortus* (Campbell e Adams, 1992; Qureshi et al., 1996). Estudos que correlacionaram a frequência de fenótipos resistentes com genótipos possivelmente envolvidos na determinação desta característica indicaram a atuação de um gene, entre outros,

com a capacidade de controlar o crescimento bacteriano intracelular em macrófagos, o gene NRAMP1 (*Natural resistance associated macrophage protein 1*) (Adams e Templeton, 1998). Embora a atuação desse gene na resistência natural de macrófagos tenha sido observada experimentalmente *in vitro* (Barthel et al., 2001). Estudos recentes *in vivo* e *in vitro* demonstraram a ausência de associação entre polimorfismos da região 3'UTR (*3'untranslated region*) do gene NRAMP1, previamente apontados como associados a resistência natural (Adams e Templeton, 1998; Barthel et al., 2001), e a resistência natural à brucelose bovina (Paixão, 2006; Paixão et al., 2006; Paixão et al., 2007).

Embora a resposta imune inata à brucelose em bovinos tenha um papel relevante no controle inicial da infecção, a resposta mais efetiva à infecção por *B. abortus* é a imunidade mediada por células, uma via da resposta imune adquirida, desencadeada pela ativação de linfócitos T específicos (Oliveira et al., 1998). Os linfócitos T reconhecem especificamente *B. abortus* através de seus receptores α/β ou γ/δ , em associação com uma molécula co-receptora CD4⁺, em linfócitos T auxiliares ou CD8⁺, em linfócitos T citotóxicos. Esses co-receptores determinam a classe do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) na célula apresentadora de antígeno, onde serão processados os fragmentos peptídicos da proteína antigênica apresentada a célula T (Janeway, 1992). Na infecção por *B. abortus*, as bactérias podem ser apresentadas por ambos os mecanismos: através do MHC de classe II, reconhecidas por receptores de células T α/β CD4⁺ ou através do MHC de classe I reconhecidas por receptores de células T α/β CD8⁺ (Janeway, 1992; Wyckoff III, 2002). Os receptores de células T γ/δ geralmente não expressam CD4⁺ ou CD8⁺, não sendo portanto, a sua via de apresentação bem definida (Janeway, 1992). Mesmo ainda pouco conhecidos, os receptores de linfócitos T γ/δ podem apresentar atividade lítica efetora *in vitro*, produzir citocinas como TNF e IFN γ , que parecem atuar na resposta imune inata por ativação de macrófagos e, possivelmente, ter participação na imunidade adquirida como mediadores da ativação de linfócitos T α/β (Ottone et al., 2000). A importância desta população celular em bovinos

se deve a observação do número elevado de células com este fenótipo em bovinos jovens com menos de um ano, o que sugere um papel mais significativo das células T γ/δ em bezerros infectados por *B. abortus* (Ko e Splitter, 2003).

A ativação de linfócitos T CD4⁺ ocorre a partir da estimulação da citocina IL-12, secretada por macrófagos infectados com *B. abortus in vitro* e *in vivo* (Jones e Winter, 1992; Jiang e Baldwin, 1993; Stivens et al., 1992). A IL12 promove a diferenciação dos linfócitos T auxiliares em linfócitos T CD4⁺ subtipo 1 (Th1). Embora a polarização de uma via de ativação seja bastante discutida na dicotomia de Th1 (celular) e Th2 (humoral) (London et al., 1998), a resposta desenvolvida pelo hospedeiro infectado por *B. abortus* é considerada do tipo Th1 devido à citocinas produzidas durante a infecção (Mossman e Coffman, 1989).

A principal citocina produzida por linfócitos Th1 é o interferon γ (IFN γ) amplamente descrita como responsável pela ativação das funções microbicidas dos macrófagos (Jiang e Bawdwin, 1993; Splitter et al., 1996; Oliveira et al., 2002). Linfócitos Th1 também são fonte de interleucina 2 (IL-2) que atua na expansão clonal de linfócitos T (Hoover et al., 1999) e contribui no controle da multiplicação de *B. abortus*, efeito claramente observado em cultivos primários de macrófagos infectados com cepas virulentas de *B. abortus* e tratados com citocinas, entre elas: IL-2 e IFN γ (Jiang e Bawdwin, 1993). Outras citocinas secretadas por fagócitos mononucleares ativadas, que têm papel importante tanto na imunidade inata quanto na imunidade adquirida são: IL-12, TNF α e interleucina 1 (IL-1). IL-12 está envolvida na resposta imune adaptativa por estímulo direto da atividade citotóxica em linfócitos T CD8⁺ (Zhan et al., 2003). O papel de TNF α parece não ser essencialmente de controle da replicação intracelular de *B. abortus*, mas de ativação de células efetoras da resposta pró-inflamatória, que limitem a multiplicação bacteriana (Zhan et al., 1996). A IL-1, por sua vez, embora recentemente tenha sido descrita sem efeitos claros na imunidade contra *B. abortus* (Golding et al., 2001), já foi demonstrada experimentalmente em murinos, como uma citocina que exerce importante papel na estimulação e/ou aumento do número de neutrófilos e macrófagos esplênicos destes

animais (Zhan et al., 1991). Antagonicamente, citocinas associadas à resposta imune do tipo Th2 também têm atuação durante a infecção por *B. abortus*, porém atua limitando a resposta inflamatória e estabelecendo em camundongos infecção persistente (Golding et al., 2001).

Embora os linfócitos T CD4⁺ e suas citocinas do tipo Th1, produzidas em resposta a ativação antígeno-específica, representem importante mecanismo de defesa do hospedeiro bovino, a ativação de linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) desempenham papel fundamental na imunidade protetora à infecção por *B. abortus* (Oliveira et al., 1998). A interação entre o linfócito T CD8⁺ efetor e os macrófagos infectados é descrita como o melhor mecanismo de defesa contra bactérias intracelulares em modelos murinos (Wyckoff III, 2002). Na infecção por *B. abortus* este mecanismo é confirmado através de ensaios experimentais em camundongos “knockout” para CD8⁺, que tem maior suscetibilidade à infecção quando comparados à camundongos normais (Oliveira et al., 1998). Adicionalmente, em outro experimento com camundongos infectados com *B. abortus*, após a indução da proliferação de linfócitos T CD8⁺, foi observada a secreção de IFN γ , assim como o aumento da capacidade citotóxica de macrófagos infectados (Oliveira e Splitter, 1995). Dessa forma, a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ tem sido reconhecida como a resposta imune celular de maior eficácia no controle da infecção por *B. abortus* (Oliveira e Splitter, 1995; Oliveira et al., 2002).

A resposta imune humoral, embora de menor importância, também tem atuação no controle da infecção por *B. abortus*. Sua relevância foi observada em camundongos que reduziram a infecção bacteriana após a transferência passiva de anticorpos IgG2a, específicos para *B. abortus* (Phillips et al., 1989). Assim como em camundongos, as imunoglobulinas preferencialmente produzidas na infecção de bovinos por *B. abortus* são IgG2 e IgG3 (Elzer et al., 1994). Apesar de demonstrarem atividade opsonizante na brucelose bovina, a atuação de IgG durante a infecção ativa é descrita como controversa, pois não permite a lise bacteriana extracelular pela via alternativa do complemento, promovendo maior fagocitose e infecção de macrófagos, o que determina o aumento do número de bactérias intracelulares e conseqüente

persistência da infecção (Hoffman e Houle, 1995). Embora sua atividade efetora seja pouco eficaz, uma característica da resposta imune humoral que deve ser ressaltada é o importante papel dos anticorpos produzidos durante a infecção no diagnóstico da brucelose bovina, essencial para identificação da doença no rebanho e estabelecimento das estratégias de controle (Brasil, 2004).

A natureza e o estímulo antigênico, associado à fatores ou características intrínsecas do hospedeiro determinam o desenvolvimento da resposta imune (Oliveira et al., 2002). A observação da capacidade de infecção por *B. abortus* em macrófagos e células não trofoblásticas, bem como do perfil/efeito de citocinas nesses tipos celulares têm acrescentado informações importantes ao estudo da patogênese da brucelose. Entretanto, até o momento, muitos são os questionamentos quanto à resposta do hospedeiro à infecção por *B.*

abortus, principalmente relacionados ao processo inflamatório observado em tecidos de bovinos infectados, que manifestam a doença através do aborto. Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* da placenta bovina têm determinado a habilidade de *B. abortus* em infectar este tecido (Samartino et al., 1994). Contudo, ainda não são conhecidas as citocinas secretadas por estes fagócitos não profissionais, os trofoblastos, bem como genes expressos em resposta à infecção, envolvidos na patogênese da infecção por *B. abortus*. Considerando que o estabelecimento de cultura primária de células trofoblásticas é difícil e requer condições laboratoriais especiais (Munson et al., 1988; Samartino et al., 1994), o modelo de explantes da membrana córion-alantóidea, previamente descrito por Samartino e Enright (1992), é uma boa alternativa para o estudo *in vitro* da patogênese da infecção, permitindo o estudo da complexa interação entre *B. abortus* e as células do trofoblasto conforme destacado no presente estudo.

CAPÍTULO 2

Avaliação de um modelo de estudo da patogênese da brucelose bovina através do explante da membrana corioalantóidea

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença infecciosa de curso crônico que tem tropismo para o sistema reprodutivo, causando aborto e infertilidade temporária. Em fêmeas bovinas gestantes, a infecção e o estabelecimento de *B. abortus* na placenta estão diretamente associados à manifestação do aborto, embora ocorram com frequência infecções subclínicas. Apesar dos vários estudos sobre inúmeros aspectos da infecção por *B. abortus*, poucos são os resultados gerados que descrevem a interação de *B. abortus* com a célula trofoblástica, particularmente quanto ao papel da célula trofoblástica na resposta inflamatória observada na placenta.

A infecção de vacas gestantes por *B. abortus* determina perdas econômicas decorrentes dos abortos e outros transtornos reprodutivos observados em rebanhos onde a brucelose está presente. As lesões observadas no útero gestante e na placenta, durante a infecção por *B. abortus*, caracterizam-se por um processo inflamatório intenso e necrose da placenta (Payne, 1959; Meador et al., 1988; Meador et al., 1989; Meador e Deoye, 1989). Recentemente, Paixão (2006) em infecção experimental observou placentite necrótica associada ao grande número de bactérias colonizando os tecidos placentários das vacas infectadas. Durante a infecção pelo trato gastrointestinal, embora uma das primeiras células alvo de infecção por *B. abortus* seja o macrófago, um importante tropismo bacteriano é descrito, particularmente no final da gestação, para células do epitélio trofoblástico (Anderson et al., 1986a,b; Meador e Deyoe, 1989).

Os mecanismos de invasão e multiplicação de *B. abortus* na espécie bovina têm sido bastante estudados, contudo, pouco se conhece sobre a interação de *B. abortus* com o trofoblasto bovino, uma célula epitelial não fagocítica intensamente invadida durante a infecção natural de vacas gestantes. A invasão e internalização de *B. abortus* em células não fagocíticas, tem sido amplamente investigada *in vitro* através de

cultivos primários de células epiteliais. Estudos utilizando células *Vero* demonstraram por microscopia eletrônica e marcações fluorescentes a habilidade de *B. abortus* em invadir rapidamente e fazer replicação bacteriana nesta linhagem epitelial (Detilleux et al., 1990a,b). Da mesma forma, anticorpos e sondas fluorescentes permitem a observação da capacidade de invasão de *B. abortus* em células HeLa, nas quais a *Brucella* altera o tráfego intracelular, permitindo intenso crescimento bacteriano (Pizarro-Cerdá et al., 1998; Pizarro-Cerdá et al., 2000). Nas células trofoblásticas, experimentos de infecção *in vivo* permitiram a observação, tanto histológica quanto ultraestruturalmente, de grande quantidade de bactérias intracelulares (Anderson et al., 1986a,b; Meador e Deyoe, 1989; Tobias et al., 1993). O cultivo primário de células trofoblásticas *in vitro* tem se mostrado pouco aplicável, contudo foi desenvolvido um modelo de cultivo de explantes da placenta bovina (Samartino e Enright, 1992) para infecção experimental de trofoblastos com amostras de *B. abortus*. Utilizando esse modelo, demonstrou-se que *B. abortus* tem maior capacidade de replicação nas células trofoblásticas durante o terço final da gestação (Samartino e Enright, 1996).

A carência de informações sobre os mecanismos de interação entre *B. abortus* e o trofoblasto bovino justifica a realização desse estudo que teve como objetivo promover a infecção experimental de trofoblastos com a amostra virulenta de *B. abortus*, utilizando explantes da membrana corioalantóidea, previamente descritos por Samartino e Enright (1992) com modificações, de forma a estabelecer um modelo de estudo *in vitro* da patogênese do processo inflamatório observado durante a infecção por *B. abortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado utilizando-se explantes de membrana cório-alantóidea preparados segundo a técnica descrita previamente por Samartino e

Enright (1992, 1996), com modificações. Para isso, foram obtidos nove úteros intactos no terço final de gestação em abatedouros da região metropolitana de Belo Horizonte-MG. A estimativa da idade gestacional correspondente a 180-240 dias de gestação foi realizada medindo-se o comprimento da nuca até a base da cauda de cada feto segundo Evans e Sack (1973), sendo as placentas utilizadas provenientes de fetos que variavam de 65 a 83 cm de comprimento. O material foi encaminhado rapidamente (tempo máximo de duas horas) ao laboratório de cultivo celular do Setor de Patologia, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG), onde foi feita antissepsia cuidadosa do perímetro, utilizando-se álcool iodado, seguida da abertura do útero com exposição e retirada asséptica de uma porção da membrana cório-alantóidea. A membrana foi mantida por 20 minutos em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) contendo antibiótico (10.000U de penicilina e 10.000µg de estreptomina) a 37°C. No interior de uma capela de fluxo laminar, a membrana foi lavada em solução de PBS (fosfato de sódio dibásico 0,0104 M; fosfato de sódio monobásico 0,036 M; cloreto de sódio 0,123 M) estéril a 37°C para completa remoção do antibiótico. Posteriormente, o material foi transferido para um recipiente com meio de cultura RPMI 1640 a 37°C, tomando-se cuidado para que toda a membrana ficasse submersa no meio de cultura. Anéis de borracha estéreis foram colocados sob a membrana cório-alantóidea nas porções intercotiledonárias, em contato com as células do âmnion. Em seguida, anéis de teflon estéreis, contendo um orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foram posicionados sobre a membrana cório-alantóidea, em contato com as células do epitélio trofoblástico, e então delicadamente pressionados contra os anéis de borracha. Com o auxílio de uma tesoura estéril, o excesso de tecido foi retirado em torno dos anéis de borracha para individualização dos explantes, que foram colocados apoiados em suportes de nylon, em placas de cultivo celular de 6 poços, estéreis, contendo meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com glutamina 4mM (Gibco; Invitrogen Carlsbad, CA, USA), piruvato 1mM, aminoácidos não-essenciais 1mM, bicarbonato de sódio 2,9mM e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) e incubados a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O mesmo meio foi colocado sobre o orifício central

do explante, local de posterior inoculação com *B. abortus* (Fig. 1).

Os explantes confeccionados foram divididos em dois grupos: um grupo controle e outro infectado. Para infecção experimental foi utilizada a amostra de referência 2308 de *B. abortus* (INTA). Os explantes de membrana corioalantóidea foram inoculados no espaço central de cada anel com volumes equivalentes de meio de cultura (RPMI 1640), contendo uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC) que correspondeu a uma multiplicidade de infecção de 1:1000 previamente estabelecida em experimento piloto. O inóculo foi feito a partir de alíquotas da amostra de referência preparadas em concentração padrão de $2,0 \times 10^8$ CFU/ml e congeladas até a utilização, quando foram crescidas em caldo brucela (Difco; Lawrence, KS, USA) por 18-24 horas em incubação a 37°C sob agitação. Nesse ensaio foram utilizados os tempos de 2, 4 e 18 horas de infecção, de acordo com o delineamento experimental de três placentas avaliadas em cada tempo (3x3). Os três tempos de incubação com *B. abortus* foram testados para estabelecimento do tempo necessário para invasão bacteriana sem perdas celulares na membrana corioalantóidea. Durante esse período os explantes foram mantidos em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após incubação os explantes foram lavados três vezes em meio de cultura RPMI 1640 e, posteriormente, suplementado com 50 µg de gentamicina/ml de meio, para inativação de bactérias extracelulares. Duas lavagens com PBS foram realizadas, para eliminação de resíduos do antibiótico, e preparação do tecido para os ensaios subseqüentes. Os explantes do grupo controle foram inoculados com meio estéril e mantidos sobre as mesmas condições indicadas acima. A manipulação do agente e material infectado foi realizada em condições de biossegurança de nível 3 conforme preconizado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, USA) (Richmond e Mckinney, 1993; Teixeira e Valle, 1996).

De cada membrana cório-alantóidea foram selecionados dois explantes para processamento histológico e coloração pela hematoxilina-eosina e outros dois explantes para realização de imunistoquímica (técnica da estreptavidina-peroxidase) utilizando-se anticorpo primário

policlonal (Santos et al., 1998). Utilizou-se anticorpo policlonal de coelho anti-*B. abortus* na diluição de 1:1000, o kit universal streptoavidina-biotina peroxidase (LSAB, Dako, EUA) e o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako, EUA). Essas técnicas tiveram como objetivo a avaliação da viabilidade das células do trofoblasto durante os experimentos em que foram realizadas infecções com *B. abortus* e a verificação da localização intracelular de *B. abortus* nas células do trofoblasto, respectivamente. Adicionalmente, análises morfométricas foram realizadas nesse material com objetivo de quantificar o número de células presentes na área de infecção do explante. A quantificação de trofoblastos foi realizada em microscópio óptico utilizando-se uma ocular micrométrica com medida linear de 240µm em objetiva de 40X. A partir da contagem do número de células dispostas linearmente, estimou-se o número de células presentes na área

de infecção (área da circunferência interna do anel, Fig. 1).

Após o período de incubação da membrana corioalantóidea com *B. abortus* e eliminação das bactérias extracelulares, três explantes de ambos os grupos (controle e infectado) foram destinados à bacteriologia. Estes foram lavados duas vezes em PBS e, em seguida, lisados com 200µL de Triton X-100 0,1% (Roche; Mannheim, Germany) estéril. O homogeneizado obtido passou por diluições seriadas na base 10 em PBS e a concentração determinada pelo “drop count method” (Miles e Misra, 1938). Em seguida, placas de ágar triptose (Difco, Lawrence, KS, EUA) foram semeadas com 20 µl de cada diluição, num total de 7 diluições por placa. Procedeu-se a contagem das colônias após incubação das placas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48 horas.

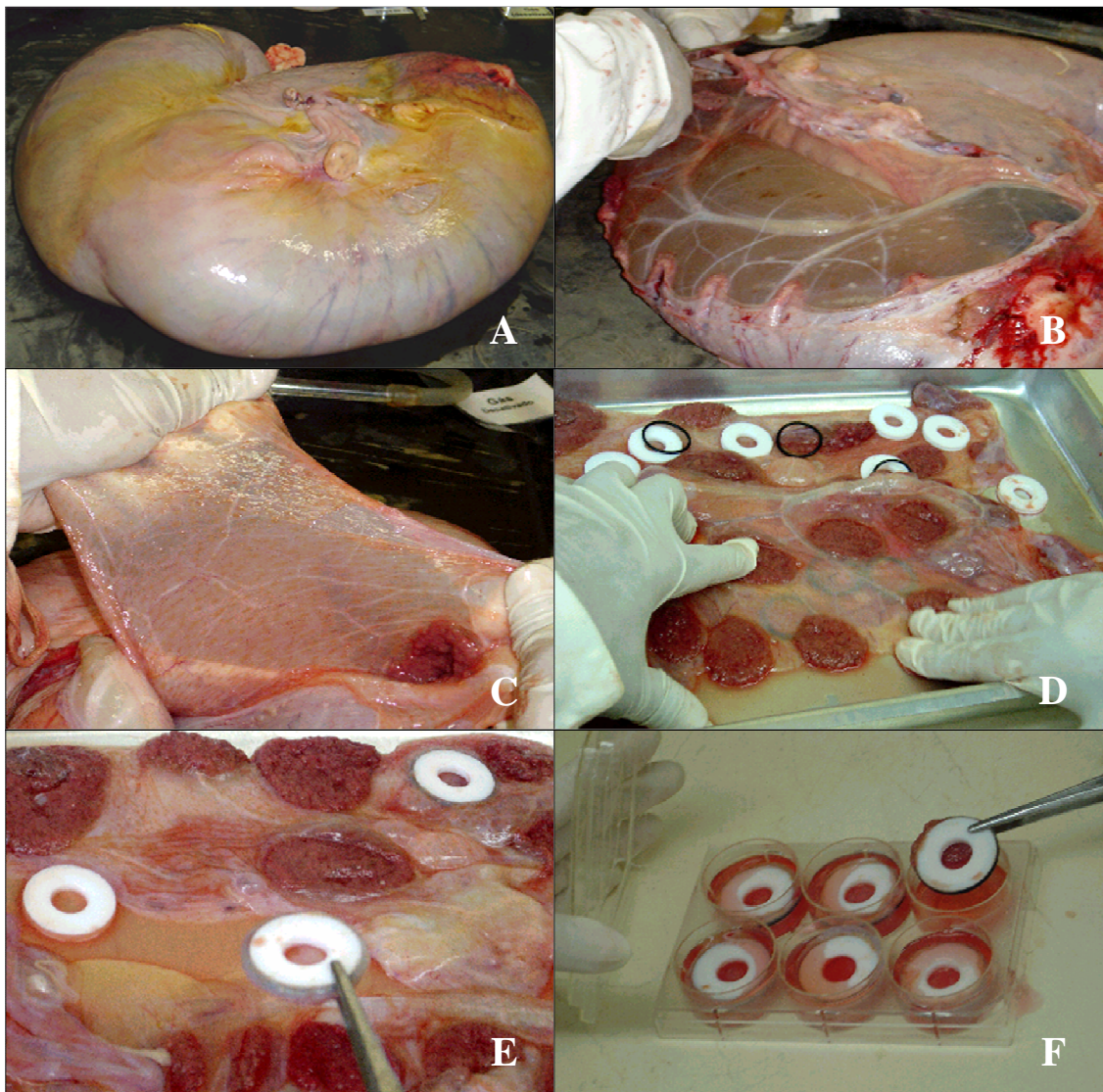


Figura 1. Ilustração da coleta de material e confecção dos explantes da membrana corioalantóidea. (A) Assepsia do útero bovino em terço final de gestação. (B) Exposição da membrana cório-alantóidea. (C) Retirada de um segmento da membrana cório-alantóidea. (D) e (E) Preparação dos explantes da membrana cório-alantóidea. (F) Preparação da placa de cultivo dos explantes para inoculação com *B. abortus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises morfométricas dos explantes da membrana corioalantóidea em cultivo resultaram em estimativas do número de trofoblastos que variou entre 13.225 e 31.651 células trofoblásticas por explante (Fig. 2). Com base em suas características morfológicas, foi possível determinar que as células trofoblásticas mantiveram-se viáveis por até 48 horas de cultivo, no entanto, perdas variáveis de trofoblastos foram mais evidentes a partir de 18 horas de cultivo. A eficiência do cultivo de trofoblastos em explantes foi semelhante à descrita por Samartino e Enright (1992), que observaram células viáveis até 24 horas após a infecção e redução significativa no número de trofoblastos a partir de 12 horas de cultivo. Embora Samartino e Enright (1996) tenham observado multiplicação bacteriana em seus ensaios, as modificações morfológicas claramente observadas nos trofoblastos às 18 horas poderiam comprometer a reprodutibilidade dos resultados e, portanto, limitaram a realização de ensaios para a determinação da taxa de replicação intracelular de *B. abortus*.

Os experimentos de infecção dos explantes permitiram a quantificação, por análise bacteriológica, do número de bactérias internalizadas no epitélio trofoblástico. Foram

testados os tempos de 2, 4 e 18 horas de incubação de *B. abortus* no explante bovino. As taxas de invasão observada nos diferentes tempos foram 1,50 (n=3); 5,27 (n=3) e 2,10 (n=3) UFC/trofoblasto, às 2, 4 e 18 horas após a inoculação, respectivamente (Fig. 3).

Portanto, o tempo estabelecido para incubação de *B. abortus* e posterior determinação de genes diferencialmente expressos após a infecção, foi de 4 horas devido ao maior número de bactérias internalizadas (5,27 UFC por trofoblasto), sem comprometimento estrutural das células trofoblásticas (Fig. 2).

Deve-se destacar que, no tempo de infecção de 18h, o número de bactérias internalizadas quantificadas na bacteriologia reduziu em relação ao observado no tempo de 4h. Esse resultado provavelmente se deve a perdas celulares ocorridas às 18h de cultivo. Considerando o procedimento de eliminação das bactérias extracelulares e a lise das células ainda viáveis (no tempo avaliado) para quantificação das bactérias internalizadas, o melhor tempo de infecção determinado foi aquele em que as células ainda mantinham sua estrutura morfológica íntegra. Adicionalmente, a avaliação imunistoquímica confirmou a localização intracelular da bactéria (Fig. 4).

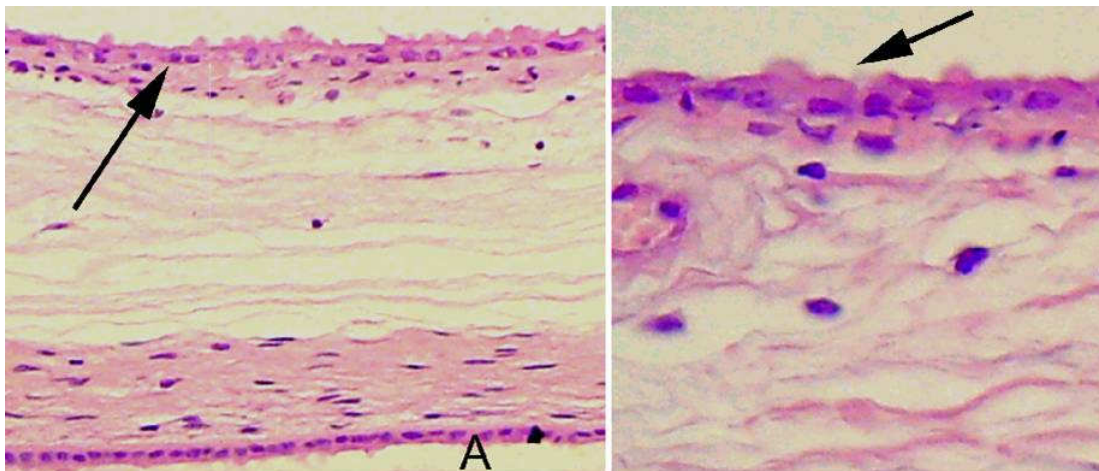


Figura 2. Explantes da membrana cório-alantóidea mantidas em cultivo por 48 horas, composta do epitélio colunar simples, tecido conjuntivo subepitelial e camada de células amnióticas. As células trofoblásticas estão indicadas com as setas, em maior aumento do lado direito. A letra "A" do lado esquerdo indica as células amnióticas. Bovino. HE.

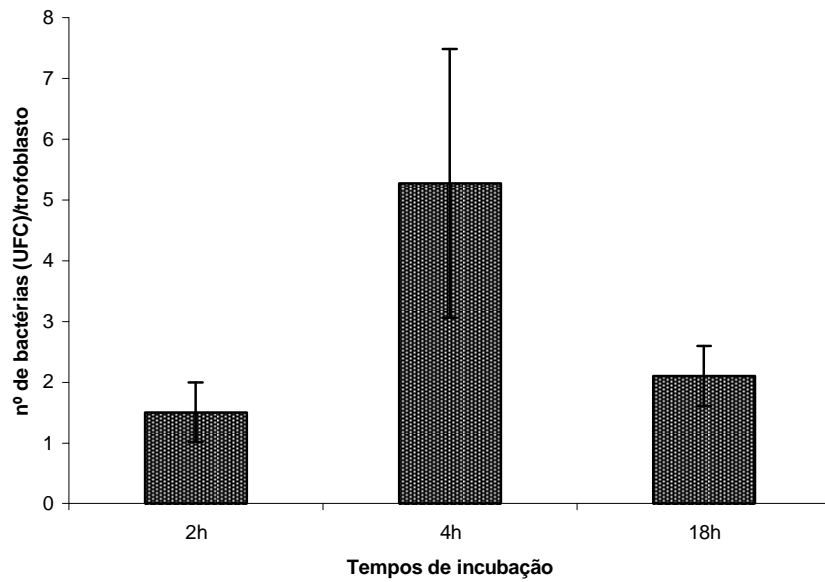


Figura 3. Número de bactérias quantificadas na contagem bacteriológica de UFC/trofoblasto em diferentes tempos de infecção utilizando o “drop count method” (Miles e Misra, 1938). As colunas indicam médias e desvio padrão.

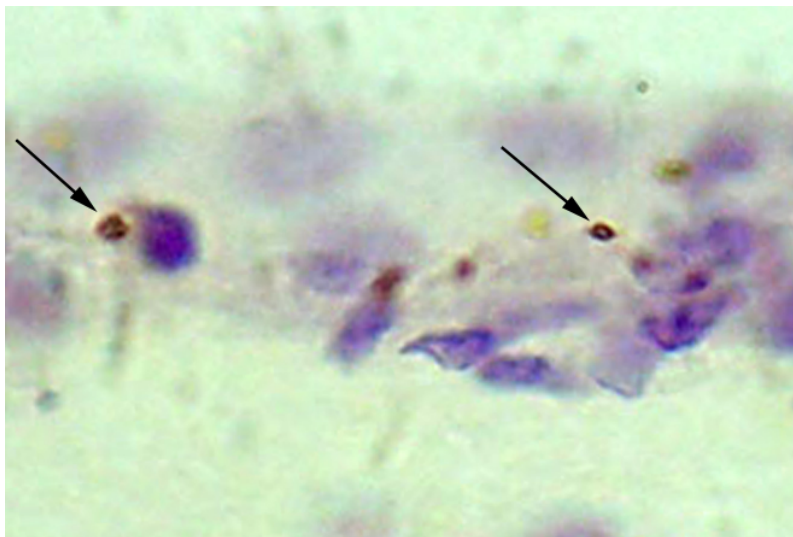


Figura 4. Localização imunistoquímica de *Brucella abortus* (setas) na célula trofoblástica do explante da membrana cório-alantóidea. Bovino. Complexo estreptoavidina-peroxidase.

A *Brucella* sp. pode infectar fagócitos e células não fagocíticas *in vivo* e *in vitro* (Detilleux et al., 1990a,b; Pizarro-Cerdá et al., 1998a,b). Além de cultivos primários de macrófagos murinos e bovinos e linhagens celulares semelhantes a macrófagos, como a J774 ou a RAW 264.7 (Campbell e Adams, 1992; Jiang et al, 1993; Celli et al., 2003), cultivos primários, assim como linhagens de células epiteliais também são utilizados em estudos de infecção com *B. abortus*, com a vantagem de apresentarem estabilidade das células em cultivo durante a infecção. No caso da infecção *in vitro* das células trofoblásticas bovinas, o modelo explante da membrana corioalantóidea permitiu a quantificação precisa da invasão do epitélio trofoblástico por *B. abortus* e possibilitou a localização intracelular das bactérias. Dependendo do objetivo do estudo, com a utilização de técnicas de microscopia confocal e/ou microscopia eletrônica o modelo também poderia ser aplicado ao estudo do tráfego intracelular de *B. abortus* em células trofoblásticas bovinas, mecanismo ainda desconhecido. Contudo, o modelo de explante utilizado neste estudo, possui algumas limitações associadas principalmente ao estresse celular devido à manipulação e modificação do ambiente tissular, que resultam em alterações morfológicas evidentes após 18 horas de cultivo. Tais alterações se caracterizam por redução no número e tamanho das células e achatamento da camada do epitélio trofoblástico, associadas à vacuolização e desprendimento da membrana basal, indicando que as células trofoblásticas são de difícil manutenção *in vitro* por período prolongado nas condições experimentais adotadas neste estudo.

Modelos de células não fagocíticas são utilizadas com frequência para o estudo da infecção por *B. abortus*. Células Vero, por exemplo, permitem a invasão de *B. abortus* que faz replicação bacteriana no interior desta célula sem promover citólise (Detilleux et al., 1990a,b; Detilleux et al., 1999). O mesmo ocorre em células HeLa, modelo utilizado em estudos de tráfego intracelular, uma vez que estas células são permissivas a replicação intracelular (Pizarro-Cerdá et al., 1998a,b). Embora a *Brucella* tenha a capacidade de invasão e replicação no interior destas células, esses mecanismos necessitam de

um tempo de interação mais prolongado. Em ensaios de infecção em células Vero, após 8 horas de incubação, somente 40 a 50% das células em cultivo continham uma ou mais bactérias intracelulares (Detilleux et al., 1990a,b). Da mesma forma, no modelo de cultivo do explante de placenta utilizado nesse trabalho, a interação entre *B. abortus* e as células trofoblásticas, aparentemente é lenta, uma vez que, considerando o tamanho do inoculo de 1000 bactérias para cada célula trofoblástica, a taxa de invasão foi muito pequena em todos os tempos de incubação avaliados. Essa característica de baixa invasibilidade de *B. abortus* na célula trofoblástica também foi descrita no trabalho de Samartino e Enright (1996).

Além da reduzida capacidade de invasão de *B. abortus* em células epiteliais, tem se destacado nesse mecanismo de interação o baixo poder endotóxico induzido por *B. abortus* quando comparado a outras bactérias intracelulares Gram negativas. Essa diferença se deve as diferenças estruturais e biológicas do lipopolissacarídeo de *B. abortus* (Godstein et al., 1992; Tumurkhuu et al., 2006). A interação de *B. abortus* com a célula hospedeira é modulada pela interação do organismo com moléculas de reconhecimento na célula infectada que atuam na sinalização para ativação do sistema imune inato do hospedeiro. O receptor para reconhecimento de *B. abortus* melhor descrito é o TLR4 (*Toll-like receptor 4*) presente na membrana plasmática de macrófagos e células epiteliais, que é ativado por LPS bacteriano (Weiss et al., 2005). Na célula trofoblástica bovina, ainda não são descritos receptores específicos de reconhecimento de *B. abortus*, contudo a utilização do modelo explante da placenta bovina poderá ser útil na determinação desses mecanismos associados a resposta imune inata do hospedeiro e patogênese da infecção.

A estrutura alterada do trofoblasto no explante da placenta bovina, assim como a utilização de trofoblastos em terço final de gestação também poderiam interferir na viabilidade celular, por serem células diretamente influenciadas pelo ambiente endócrino e metabólico do período gestacional. No entanto, em experimentos preliminares a adição de substâncias envolvidas no ambiente uterino ou fatores de crescimento

como: eritritol, EGF (Epithelial Growth Factor) e ITS (insulina, transferrina e selenito de sódio) ao cultivo, não modificaram a característica de fragilidade celular ou de invasão de *B. abortus* no trofoblasto *in vitro*. A produção do eritritol tem sido descrita como um fator importante durante a infecção *in vivo* da placenta bovina por *B. abortus*, uma vez que, o mesmo atua como agente facilitador da sobrevivência bacteriana servindo como fonte de carbono e energia para *B. abortus* (Samartino e Enright, 1996). Contudo, em algumas espécies, nas quais o eritritol não é produzido, também ocorre infecção da placenta e aborto, indicando que esta substância não é essencial para a replicação bacteriana *in vivo*.

O modelo de cultivo de explantes da membrana cório-alantóidea, utilizado neste estudo, manteve as células trofoblásticas viáveis após as 4 horas de infecção, sem alterações morfológicas, embora sua viabilidade observada em experimentos pilotos se mantivesse íntegra até as 12 horas de cultivo. Embora a taxa de internalização observada no modelo seja baixa, a célula trofoblástica cultivada através do explante é permissiva a invasão por *B. abortus*. Esse modelo é, portanto, aplicável em estudos que envolvam os mecanismos de patogênese da infecção por *B. abortus*, particularmente durante os estágios iniciais da infecção trofoblástica.

CAPÍTULO 3

Perfil de expressão gênica em trofoblastos bovinos infectados com *Brucella abortus*

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina tem grande importância como doença reprodutiva em fêmeas gestantes, pela intensa lesão observada em placentas de vacas naturalmente infectadas (Paixão, 2006). Durante a infecção aguda de vacas gestantes por *B. abortus*, mais de 85% das bactérias estão localizadas na placenta e no fluido alantóico (Smith et al., 1961). Muitas são as implicações do papel da multiplicação de *B. abortus* no interior de células trofoblásticas e conseqüente placentite. Essas características são mencionadas como fatores determinantes na patogênese do aborto induzido por *B. abortus*. Contudo, as informações científicas sobre a interação entre *B. abortus* e o trofoblasto bovino são bastante escassas.

Novas técnicas biológicas e moleculares têm melhorado as perspectivas de estudo da patogênese de doenças infecciosas em bovinos. Uma tecnologia recente que tem alcançado grande aplicação nas pesquisas que buscam entendimento da relação patógeno/hospedeiro em diferentes espécies é a técnica de microarranjo (Wilson et al., 2005). Um microarranjo de DNA consiste em fragmentos ou sondas de DNA complementar (cDNA) ou oligonucleotídeos conhecidos e catalogados, fixos a uma lâmina de vidro ou outro tipo de suporte sólido, distribuídos em um padrão ordenado. Sua principal aplicação é na análise em larga escala de perfis de expressão gênica diferencial em células, tecidos ou organismos inteiros (Jayapal E Melendez, 2006). As técnicas mais comumente utilizadas incluem microarranjos de oligonucleotídeos, microarranjos de cDNA e análises seriadas de expressão gênica (Fodor et al., 1993; Schena et al., 1995; Veuculesco et al., 1995). Embora recente, a tecnologia dos microarranjos tem sido aplicada à espécie bovina, sendo que as anotações atuais e construções de lâminas de microarranjo representando grande número de genes bovinos permitem a análise quantitativa do transcriptoma de células e tecidos (Everts et al., 2005), como a placenta bovina, que é o objeto

deste estudo sobre a patogênese da infecção por *B. abortus*. Uma lâmina de microarranjo contendo

13.249 oligonucleotídeos foi recentemente desenvolvida para análises genômicas funcionais em bovinos, correspondendo a uma versão aprimorada do microarranjo previamente descrito por Everts et al. (2005). Esta nova versão tem grande aplicação, por ampliar as possibilidades de estudo de genes diferencialmente expressos em situações fisiológicas ou patológicas na espécie bovina.

A célula trofoblástica tem sido alvo de investigações moleculares, no sentido de conhecer sua biologia, fisiologia e metabolismo. Genes como: o interferon τ (Bazer et al., 1997), metaloproteinases de matriz (Witherside, 2001), proteoglicanos, moléculas de adesão, integrinas, fatores de crescimento e seus receptores (Ushizawa et al., 2004) envolvidos nos processos de implantação do embrião e desenvolvimento da placenta têm sido descritos através de técnicas de microarranjo (Ushizawa et al., 2005; Ushizawa et al., 2007). No entanto, não existem informações na literatura sobre genes expressos no final do processo gestacional por células trofoblásticas sem infecção ou sob a condição de atuação de um patógeno.

Estudos de expressão gênica, realizados com a técnica de microarranjo, em linhagens de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) infectados com *B. abortus*, demonstraram aumento na expressão de genes relacionados com a resposta inflamatória durante a infecção (Eskra et al., 2003). Esta técnica também permitiu a determinação do perfil de expressão gênica no baço de camundongos infectados com *B. abortus* (Roux et al., 2007). O processo inflamatório da placenta determinado por *B. abortus* é marcado pela ocorrência de aborto e pela grande quantidade de bactérias nas células trofoblásticas (Anderson et al., 1986a,b; Meador e Deyoe, 1989). O conhecimento dos genes transcritos pelo trofoblasto durante a infecção pode contribuir significativamente para o entendimento da patogênese do aborto induzido

por *B. abortus* em bovinos. Portanto, o objetivo desse estudo foi determinar, pela da técnica de microarranjo, o perfil de expressão gênica por células trofoblásticas bovinas durante os estágios iniciais da infecção por *B. abortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, para ensaios de infecção, os explantes da membrana corioalantóidea descritos no Capítulo 2. O delineamento experimental baseou-se na utilização de 6 placentas, sendo confeccionados 12 explantes controle (não infectados) e 12 explantes infectados de cada placenta, para obtenção de quantidade suficiente de RNA a serem utilizados nos ensaios de microarranjo. A infecção experimental foi feita com uma suspensão equivalente a $1,0 \times 10^7$ UFC da cepa de referência 2308 de *B. abortus*, por 4 horas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O grupo controle foi mantido com volumes equivalentes de meio de cultura, sob as mesmas condições de incubação. Após eliminação das bactérias extracelulares, as células trofoblásticas foram lavadas e submetidas à extração de RNA.

A extração de RNA foi realizada com Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). Resumidamente, o método consistiu em uma etapa inicial de lise e homogeneização da superfície trofoblástica do explante com 1 mL de Trizol (Invitrogen) por 5 minutos a temperatura ambiente (entre 22 a 25°C) para completa dissociação dos complexos nucleoproteína. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de homogeneização, 2 a 3 minutos de incubação a temperatura ambiente e centrifugação à 12.000g por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases, onde a fase incolor superficial (fase aquosa) contém o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos à 4°C para precipitação do RNA. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 7.500g por 5 minutos à 4°C. O RNA foi solubilizado em água livre de RNase e imediatamente estocado a -80°C.

A qualidade das amostras de RNA de cada placenta (n=6) foi analisada por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose/formaldeído (Fig. 4). A transcrição reversa e amplificação por PCR de um gene constitutivo, o GAPDH (Fig. 5), também foi realizada para confirmação da qualidade do RNA. Foram preparados três *pools* de amostras de RNA, provenientes de duas placentas cada pool. Estes *pools* de RNA foram então purificados em colunas (Qiagen RNeasy, CA, EUA) para eliminação de impurezas e moléculas de RNA de baixo peso molecular.

Foi utilizado um microarranjo de alta densidade com 13.249 oligonucleotídeos, que corresponde a uma versão aperfeiçoada do microarranjo bovino previamente descrito por Everts et al. (2005). As laminas contendo o microarranjo foram fornecidas pelo Dr. Garry Adams (*Texas A&M University, USA*) e pelo Dr. Harris Lewin (*University of Illinois, USA*). O procedimento iniciou-se pela transcrição reversa do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA) marcado com amino allyl dUTP. Após purificação (clean up Quiagen) e precipitação do cDNA, iniciou-se a etapa de acoplamento dos marcadores (Alexa Fluor 555 (Invitrogen)/ Cy3 e Alexa Fluor 647 (Invitrogen)/ Cy5) ao cDNA, onde os *pools* controle foram marcados com Alexa 555 e os *pools* infectados foram marcados com Alexa 647. Uma nova purificação foi realizada após marcação para inibição dos corantes Cy não incorporados. O cDNA marcado e quantificado foi hibridizado por 48 horas em estação de hibridização. Depois de lavadas, as lâminas foram escaneadas e as imagens foram digitalizadas e gravadas para posterior análise. A normalização dos dados e análise estatística dos resultados foi realizada pelos programas Genepix (Molecular Device, Downingtown, EUA) e Genespring (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).

Alguns genes relacionados à inflamação e resposta imune, que apresentaram no microarranjo alterações na expressão de no mínimo 2 vezes, foram selecionados para confirmação e validação dos resultados do microarranjo por RT-PCR em tempo real, com normalização baseado na expressão de GAPDH. A sequência destes mRNA foram obtidas no banco de dados GeneBank para delineamento de iniciadores específicos para amplificação das sequências bovinas. A sequência dos iniciadores utilizados e o produto esperado estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de genes e iniciadores para o PCR em tempo real

Gene	Iniciadores	Produto
Complemento 9	5'- ACAGCAGGCTATGGGATCAA -3' 5'- TGTCAAAAGGTGTGCTTAGGG-3'	58 nt
Interleucina 4	5'- TGTCACTGCAAATCGACACC-3' 5'- ATGCCAGCAGGAAGAACA-3'	74 nt
Linfotoxina beta	5'- CAGGAGCCACTTCTCTGGTG-3' 5'- TTACCAGTCTCCCTGATCCT-3'	96 nt
Amilóide sérico A4	5'- CTCCTGCTCCTCTGCTCTC-3' 5'- GTGACCCTGTGTCCCTGTCT-3'	77 nt
Fator de necrose tumoral	5'-GAGGAGGTTGACACAGCACA -3' 5'- GGATGAGAGGGACTTGAGAGAA -3'	84 nt
Ligante de quimiocina 11	5'- GTTCAAGGCTTCCCATGTT -3' 5'- TCTGCCACTTTCCTGCTTTT -3'	77 nt
GAPDH	5'- ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACG -3' 5'- TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGGTC -3'	121 nt

Os ensaios de PCR em tempo real foram precedidos de transcrição reversa das amostras de RNA utilizando-se o kit TAQMAN reverse transcription (Applied biosystems, Foster City, CA, USA). Para a síntese do cDNA, foram utilizados 2µg de RNA, em 50µL de uma solução contendo tampão de transcrição reversa, 5,5 mM de MgCl₂, 500 µM de dNTPs, 2,5 µM de *random hexamer*, 0,4 U/µL de inibidor de RNase, 1,25 U/µL de transcriptase reversa. Na reação de PCR em tempo real foi utilizado SYBR Green (PCR Master Mix, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), com 2µg de cDNA e 600 ng de cada iniciador em uma reação com volume final de 25µL. No aparelho de PCR em tempo real (7900HT Fast Real-Time PCR System-Applied Biosystems), os parâmetros de reação utilizados foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados foram analisados utilizando método comparativo de Cts (Applied Biosystems), onde a expressão gênica diferencial nas amostras infectadas foi calculada em relação às amostras controle, conforme previamente descrito por Raffatelli et al. (2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O RNA obtido apresentava boa qualidade, sem degradação evidente (Fig. 5), sendo possível a amplificação do mRNA constitutivo de GAPDH de todas as amostras (Fig. 6).

O resultado da hibridização foi avaliado pelo programa GenePix para a determinação da intensidade do sinal de hibridização em cada oligonucleotídeo (Fig. 7). Os diagramas de intensidade de marcação, normalização e determinação dos genes diferencialmente expressos, obtido pelo programa GeneSpring estão ilustrados nas figuras 8, 9 e 10. Na Fig. 8 é demonstrada a intensidade de marcação muito semelhante entre os dois corantes utilizados. Na Fig. 9, as retas formadas no prisma ilustram todos os genes avaliados no ensaio, enquanto, na Fig. 10, utilizando a estratégia de análise de pelo menos 2 vezes de alteração na expressão (tanto aumento quanto diminuição) em relação ao controle não infectado, as retas do prisma consistem nos genes diferencialmente expressos, cujas variações foram estatisticamente significativas entre os ensaios independentes

com diferentes *pools* de RNA ($p < 0.05$), ou seja, foram selecionados somente as variações de expressão que foram consistentes em todos os experimentos. Nessas figuras observa-se que de um total de genes hibridizados e fluorescentes que são naturalmente expressos quando

comparados com as amostras controle sem infecção, um número reduzido de genes mostrou expressão diferencial, o que sugere uma interação muito discreta de *B. abortus* com a célula trofoblástica após o tempo de infecção de quatro horas utilizado neste ensaio.

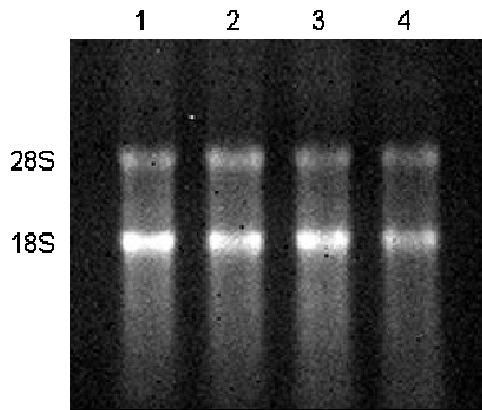


Figura 5. Gel de agarose-formaldeído evidenciando amostras de RNA obtidas da extração da membrana córioalantóideia bovina. São observadas as bandas de RNA ribossomal 28S (4,7kb) e 18S (1,9kb).

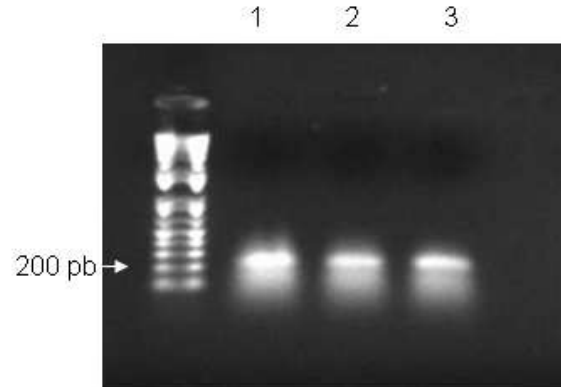


Figura 6. Gel de agarose mostrando a amplificação de parte do gene GAPDH, a partir do cDNA obtido da transcrição reversa de amostras de RNA total extraídos da membrana córioalantóideia bovina.

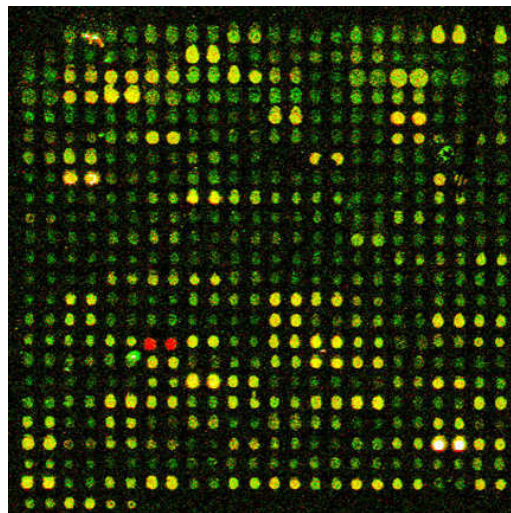


Figura 7. Imagem representativa da intensidade de fluorescência obtida nos microarranjos após hibridização. Cada círculo representa um gene marcado com os fluorocromos (Alexa 555 e Alexa 647).

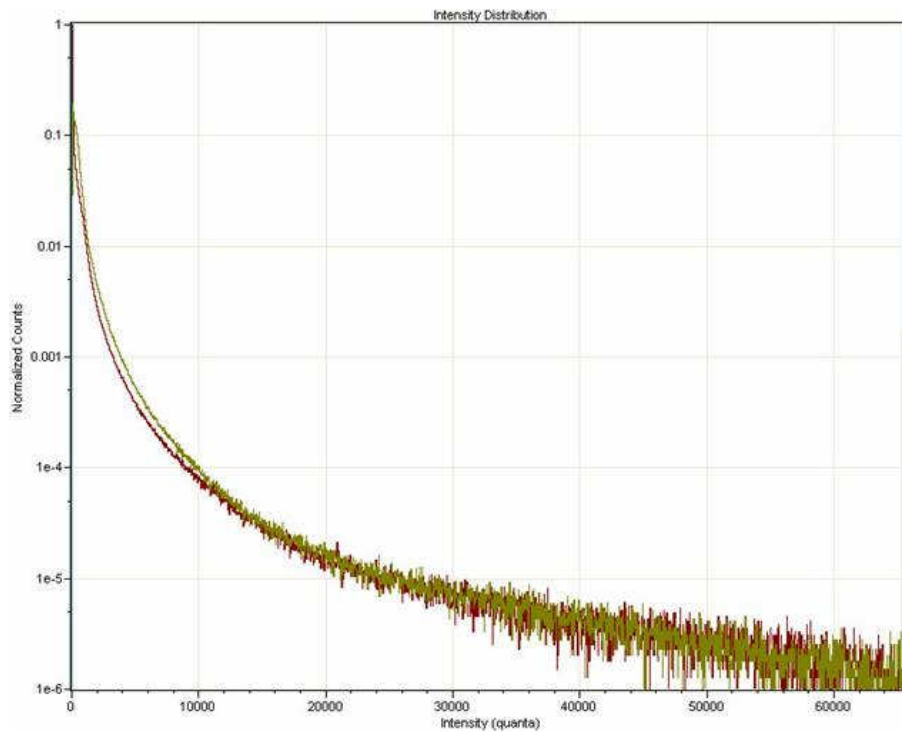


Figura 8. Intensidade de marcação dos corantes utilizados nas amostras experimentais. Amostras controle marcadas com Alexa 555 (verde) e amostras infectadas com *B. abortus* marcadas com Alexa 647 (vermelho). A representação gráfica demonstra a mesma intensidade de marcação dos dois corantes, condição ideal para análise dos dados.

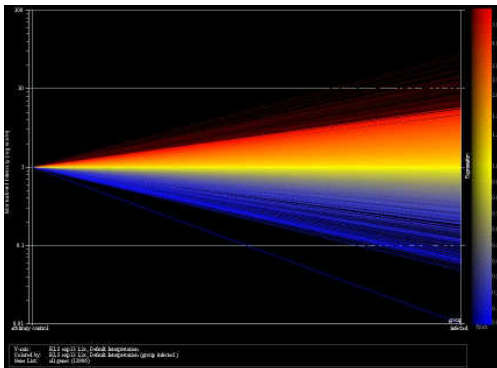


Figura 9. Análise da expressão gênica usando o microarranjo de alta densidade, com 13.249 oligonucleotídeos. Representação da variação de expressão de todos os genes representados no microarranjo, sendo que eixo esquerdo indica a intensidade das amostras controle (arbitrariamente estabelecida como valor = 1) e o eixo direito representa a intensidade do sinal durante a infecção por *B. abortus*. Cada feixe do prisma representa um gene avaliado e marcado durante o ensaio.

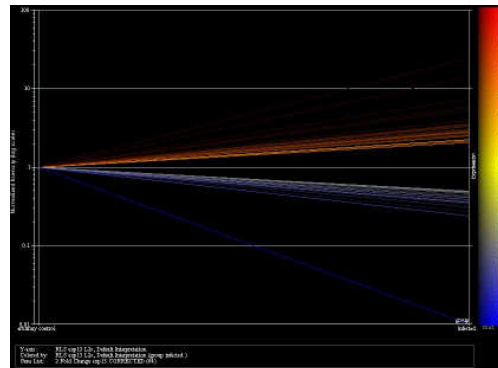


Figura 10. Representação dos genes selecionados após análise das variações de expressão (mínimo de 2 vezes), com expressão diferencial estatisticamente significativa ($p < 0.05$), quando comparados os experimentos independentes. O eixo esquerdo indica a intensidade das amostras controle (arbitrariamente estabelecida como valor = 1) e o eixo direito representa a intensidade do sinal durante a infecção por *B. abortus*. Quanto mais distante de 1, maior é a expressão diferencial.

A análise do microarranjo resultou na identificação de 25 genes que apresentaram elevação significativa na expressão após infecção por *B. abortus* (Tabela 2), ou seja, genes que apresentaram aumento de pelo menos duas vezes nos explantes infectados quando comparados aos controles e de forma consistente entre os experimentos. Foram também identificados 36

genes que demonstraram redução de expressão (Tabela 3). A variação na expressão destes genes e suas significâncias estatísticas são descritas nas tabelas 2 e 3. Os genes foram agrupados por categorias de expressão para auxiliar na interpretação dos resultados (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Genes de expressão aumentada na membrana corioalantóidea infectada com *Brucella abortus* 4 horas após inoculação.

n° GenBank	Variação	Valor de P	Gene
Resposta Imune e Inflamação			
BQ940635	2,95	0,00873	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14
AL833759	10	0,00637	hypothetical protein FLJ39827
Transcrição			
BX537915	2,008	0,000012	transcription elongation factor A (SII), 3
BQ575777	2,793	0,0126	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa
AF353674	2,849	0,0226	BTB (POZ) domain containing 6
Ciclo celular			
AK090488	2,242	0,0239	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform
NM_057749	3,194	0,0464	cyclin E2
AY376439	2,04	0,0381	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene
Transporte			
NM_021614	10	0,00637	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2
Sinalização e sinal de transdução			
AK074259	4,184	0,00621	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2
CN434563	2,439	0,028	HSPC054 protein
Regulação			
NM_024321	2,066	0,046	hypothetical protein MGC10433
BM729023	2,77	0,0443	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2
Adesão			
BQ716387	2,061	0,00518	cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)
Metabolismo			
BX647562	2,008	0,000808	hypothetical protein MGC4767
CR627424	4,184	0,026	Transcribed locus, moderately similar to XP_526970.1 [Pan troglodytes]
NM_020773	2,415	0,0187	TBC1 domain family, member 14
Membrana			
AK091890	2,024	0,0482	CD34 antigen
Outros			
BM563524	2,053	0,011	PWWP domain containing 1
BU729749	2,096	0,00666	similar to CG14894-PA
NM_024067	2,169	0,024	chromosome 7 open reading frame 26
NG010008A20C05	2,61	0,0485	
BM363643	2,688	0,00594	
W31247	3,69	0,0335	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
CN434037	2,564	0,0444	

Tabela 3. Genes de expressão reduzida na membrana corioalantóidea infectada com *Brucella abortus* 4 horas após inoculação.

n° GenBank	Varição	Valor de p	Gene
Reposta Imune e Inflamação			
NM_001737	14,09	0,000306	complement component 9
CD640452	7,379	0,0125	interleukin 4
BQ064345	3,321	0,00472	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
BG618424	2,977	0,00241	serum amyloid A4, constitutive
AW452023	2,831	0,0138	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
U66096	2,162	0,000687	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
Trancrição			
NM_016276	3,451	0,0384	serum/glucocorticoid regulated kinase 2
AW266874	3,288	0,01	
Ciclo celular			
D15049	2,124	0,00767	protein tyrosine phosphatase, receptor type, H
Stress			
AK098671	4,016	0,0199	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
CR455999	2,243	0,000287	glutathione synthetase
Transporte			
BC006404	2,753	0,00853	suppressor of potassium transport defect 3
NM_170736	2,524	0,0103	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15
Sinaliz e Sinal de transdução			
AK092516	2,657	0,0238	hypothetical protein LOC150084
NM_145803	2,222	0,0169	TNF receptor-associated factor 6
Regulatório			
CN432381	24,54	0,0258	
NM_000035	5,368	0,0255	aldolase B, fructose-bisphosphate
BG117301	3,564	0,0223	pleiotropic regulator 1 (PRL1homolog, Arabidopsis)
BX648731	2,555	0,0426	junction-mediating and regulatory protein
AI971356	2,482	0,0197	Transcribed locus, strongly similar to NP_000446.1 serine/threonine kinase 11
BE294317	2,142	0,0444	p53 and DNA damage regulated 1
Metabolismo			
AA035275	2,886	0,00485	Transcribed locus, moderately similar to XP_126676.1 RIKEN cDNA 1810057P16 gene [Mus musculus]
NM_031438	2,884	0,045	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 12
BC047129	2,519	0,0446	flavin containing monoxygenase 1
BM808152	2,255	0,0355	adenine phosphoribosyltransferase
Y14385	2,235	0,0465	inositol polyphosphate phosphatase-like 1
Membrana			
DN547823	3,502	0,0323	
Outros			
CR456122	3,452	0,0454	
AK094654	3,094	0,00241	chromosome 14 open reading frame 129
DN642227	3,082	0,00241	
NM_005382	2,912	0,0418	neurofilament 3 (150kDa medium)
CN438371	2,824	0,0337	
AK125351	2,805	0,0136	RNA binding motif protein 21
NM_182684	2,789	0,0297	Uroplakin IIIb
BC015335	2,721	0,00418	immature colon carcinoma transcript 1
BF440457	2,649	0,0195	Transcribed locus

Considerando a resposta inflamatória observada na placenta de vacas durante a infecção com *B. abortus*, a hipótese formulada para infecção *in vitro* de trofoblastos oriundos de placentas em terço final de gestação através do modelo explante da membrana corioalantóidea, foi forte indução de genes relacionados à resposta imune inata e inflamação. Contudo, ao contrário do esperado, os resultados do microarranjo demonstraram redução na expressão de alguns genes relacionados à resposta pró-inflamatória após quatro horas de infecção do trofoblasto

(Tabela 3). Esse resultado sugere que nos estágios iniciais de infecção a interação de *B. abortus* com as células trofoblásticas não resulta em indução de resposta inflamatória mediada por fatores pró-inflamatórios de origem trofoblástica.

Uma interação discreta de *B. abortus* com células epiteliais de bovinos nas fases iniciais de infecção, sem lesões ou alterações do metabolismo celular, é o que se observa no intestino, que é a porta de entrada da infecção nos casos de infecção natural (Ackerman et al.,

1988), onde não ocorre um processo inflamatório significativo. A *B. abortus* invade células epiteliais do trato gastro-intestinal, mas não permanece neste tecido por muito tempo, no interior de macrófagos, as bactérias seguem para outros órgãos e tecidos, onde ocorrem alterações inflamatórias. A outra célula epitelial alvo de invasão pela *B. abortus* é o trofoblasto da placenta bovina, sendo que este processo, ao contrário do que ocorre no epitélio intestinal, está associado a reação inflamatória intensa durante infecção *in vivo* (Meador e Deyoe, 1989). Entretanto, ainda não foi determinado o tempo necessário para interação de *B. abortus* com o trofoblasto bovino, que corresponda ao período que vai desde o início da infecção até o desenvolvimento do processo inflamatório na placenta. Além disso, o papel das células trofoblásticas na indução da resposta inflamatória da placenta não é conhecido, o que motivou o presente estudo. Considerando os resultados deste estudo, a reação da célula trofoblástica nos estágios iniciais da infecção é semelhante à observada em células epiteliais do trato gastro-intestinal. Contudo, durante a infecção *in vivo*, a bactéria permanece nas células trofoblásticas por período mais prolongado do que o tempo utilizado neste estudo (4 horas após a inoculação) e, portanto, os resultados deste estudo não eliminam a possibilidade da ocorrência de resposta pró-inflamatória tardia pelas células trofoblásticas *in vivo*.

Um achado importante entre os resultados de microarranjo foi a redução de quatro genes associados à superfamília TNF (*Linfotoxina beta*, *ligante de TNF membro 8*, *Quimiocina (C-X-C motif)* e *receptor de TNF associado ao fator 6*). A maioria dos membros da superfamília TNF é expressa por células envolvidas na resposta imune. Contudo, sua expressão também tem sido descrita em células epiteliais. Suas atividades biológicas no hospedeiro envolvem participação nos mecanismos de inflamação e resposta imune protetora contra doenças infecciosas. A ativação de receptores da família TNF determina o recrutamento de muitas proteínas adaptadoras intracelulares que ativam vários mecanismos de transdução de sinal e transcrição de genes que atuam durante o processo infeccioso (Hehlgans e Pfeffer, 2005). A expressão de TNF tem sido descrita durante a infecção por *B. abortus* como mecanismo de resistência do hospedeiro à

infecção. Embora essa molécula já tenha sido indicada como co-fator para estimulação da produção de IFN γ por linfócitos, atualmente sabe-se que TNF contribui pra resistência por mecanismos independentes de IFN γ (Zhan et al., 1996). A ativação precoce de TNF após a infecção por *B. abortus* requer a ativação de NF- κ B via receptor TLR2 e é dependente da ligação do receptor com a molécula adaptadora MyD88, esse mecanismo foi demonstrado *in vivo* em camundongos e *in vitro* em esplenócitos de camundongos (Zhan et al., 1996; Lapaque et al., 2006). TNF é associado ao influxo e ativação de macrófagos nos sítios de infecção e embora não seja descrito em todos os casos em que TNF é expresso, este fator está envolvido na formação de uma reação granulomatosa em algumas infecções (Kindler et al., 1989). Durante a infecção de camundongos, a depleção de TNF α resultou em infecção exacerbada de macrófagos por *B. abortus* que demonstraram após algumas semanas acumulação massiva de células no baço resultando em esplenomegalia (Zhan et al., 1996). Esses resultados indicam que a molécula de TNF α atua com duas funções distintas, uma na imunidade e outra na imunopatologia. A estrutura do LPS também tem influência na ativação de membros da família TNF. Bactérias com LPS não clássico, como é o caso de *B. abortus*, tem um menor poder de indução de TNF α e esta característica pode constituir em vantagem evolucionária na adaptação e sobrevivência intracelular (Lapaque et al., 2006). Os resultados do microarranjo sugerem a participação dos genes da família TNF no início da infecção, como genes envolvidos na resistência a infecção, já que experimentalmente foram suprimidos logo após a infecção com *B. abortus*, como um provável mecanismo de escape de uma resposta protetora da célula hospedeira.

Os outros genes pró-inflamatórios de expressão reduzida na análise do microarranjo, entre eles, um componente do complemento (complemento 9) que apresentou uma variação de expressão bastante reduzida, também tem sua atuação na resposta imune inata contra *B. abortus*, quando expressos pelo organismo ou pela célula hospedeira, seja na opsonização, ativação de células ou atividade efetora (Corbeil et al., 1988). Contudo, a sub-regulação desses genes reforça a hipótese de supressão da resposta imune no

hospedeiro, durante os estágios iniciais de infecção.

O perfil de expressão gênica observado no modelo de infecção por *Brucella* em camundongos, é caracterizado pela expressão de citocinas CXC no baço durante os primeiros dias de infecção, que se correlaciona com a infiltração de neutrófilos no fígado nos primeiros três dias após a infecção, que posteriormente é substituída por uma inflamação granulomatosa em uma semana pós-infecção (Roux et al., 2007). O camundongo tem sido extensivamente usado como modelo para estudos de persistência da infecção por *Brucella*, inclusive persistência por até cinco meses, que está associada a localização intracelular em macrófagos e esplenomegalia (Birmingham e Jeska, 1981; Meador et al., 1986; Stevens et al., 1994). As mudanças acima mencionadas na expressão gênica em baços de camundongos infectados com *B. abortus* foram observadas aos três dias após a infecção, contudo, não é possível uma comparação direta destes resultados com os dados gerados no presente estudo, tendo em vista que o desenvolvimento da infecção no camundongo *in vivo* não reproduz a doença em bovinos e a placentite induzida por *B. abortus*.

Em um microarranjo realizado em uma linhagem celular de macrófagos murinos infectados com *B. abortus*, após 4 horas de infecção foi detectada

significativa elevação na regulação de alguns marcadores de resposta inflamatória como Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina 1 β e α (Eskra et al., 2003). Deve-se ressaltar que por ser um fagócito profissional, o macrófago interage mais rapidamente com *B. abortus*, o que permite o desenvolvimento precoce de uma resposta inflamatória a infecção (Ko e Splitter, 2003; Eskra et al., 2003), o que, segundo os resultados apresentados no presente estudo, aparentemente não ocorre em trofoblastos infectados *ex vivo* durante o mesmo período de tempo (4 horas).

A alteração de expressão dos genes associados à inflamação e resposta imune nos explantes foi confirmada por RT-PCR em tempo real, visando a validação dos resultados do microarranjo. Foram mensuradas a quantidade de mRNA para os seguintes genes: complemento 9 (C9), interleucina 4 (IL-4), linfotoxina beta (LFT beta), amilóide sérico A4 (SAA4), membro 8 da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF M8), quimiocina CXC ligante 8 (C-X-C Lig 8). Os resultados dos ensaios PCR em tempo real demonstraram redução na expressão dos genes avaliados e dessa forma confirmaram e validaram os achados do microarranjo que apresentaram a mesma resposta de redução na expressão de genes pró-inflamatórios. Essa variação dos genes está representada na Fig. 11.

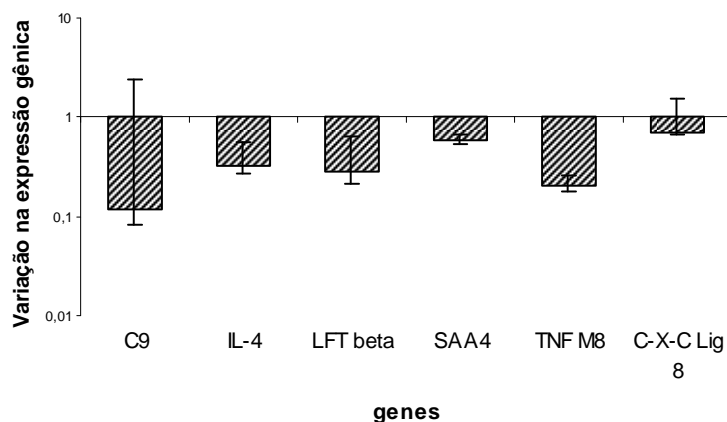


Figura 11. Expressão de genes relacionados à resposta imune e inflamação através do RT-PCR em tempo real em explantes da membrana corioalantóidea infectada com *Brucella abortus* às 4 horas após inoculação. As colunas indicam média e erro padrão da variação na quantidade de mRNA em relação aos explantes controle não-infectados, para os genes indicados na figura.

Apesar dos relatos da indução de citocinas pró-inflamatórias por *B. abortus*, estudos recentes têm mostrado novas teorias sobre a cinética de expressão dessas moléculas durante os estágios iniciais de infecção. Alguns trabalhos demonstram experimentalmente, em cultivos celulares e infecção aguda em camundongos, que a *Brucella* é um patógeno de baixo poder de indução da resposta imune inata na célula hospedeira, principalmente quando comparada com outras bactérias como *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (Duenas et al., 2004; Barquero-Calvo et al., 2007). Esse mecanismo de baixo poder endotóxico, provavelmente é uma estratégia de *B. abortus* para escapar do sistema imune inato. Esses dados previamente publicados estão de acordo com os resultados obtidos no microarranjo e RT-PCR em tempo real do explante da membrana corioalantóidea no presente estudo, onde não foi observado o aumento da expressão de genes relacionados à resposta imune e inflamação.

O LPS de *B. abortus*, como descrito no Capítulo 1, possui características diferenciadas de outras bactérias Gram-negativas o que determina efeitos patofisiológicos distintos e diferentes habilidades de interação com o sistema de receptores semelhantes a *toll* (TLR) (Duenas et al., 2004). O receptor TLR de interação com *B. abortus* é o TLR4, descrito como receptor de sinalização para a resposta imune inata do hospedeiro, cuja via de sinalização envolve outras moléculas como MyD88 envolvida na transdução do sinal, resultando na transcrição de genes de citocinas e/ou quimiocinas pró-inflamatórias (Huang et al.,

2003). A interação do LPS de *B. abortus* e o receptor TLR4 é bastante discutida, pois embora há evidências de que tal interação ocorra, a mesma é, aparentemente, tardia e de pouca intensidade, como descrito em camundongos por Barquero-Calvo et al. (2007). Esses autores sugerem essa relação lenta e discreta como uma estratégia da *Brucella* para evasão do sistema imune inato nos estágios iniciais de infecção. Cabe ressaltar que embora as moléculas de TLR, especialmente TLR4, já tenham sido descritas no tecido placentário humano (Holmlund et al., 2002), essa molécula ainda não foi descrita no trofoblasto bovino, portanto, não é clara a forma de reconhecimento de *B. abortus* pela célula trofoblástica bovina. Além da característica de *B. abortus* de não ser um bom ativador de resposta inflamatória, em função da constituição de seu LPS não clássico (Cardoso et al., 2006; Tumurkhuu et al., 2006), os resultados obtidos no microarranjo dos explantes de placenta, consistem em uma forte evidência de supressão da resposta imune inata induzida por *B. abortus* nos estágios iniciais de infecção na placenta bovina.

Esses resultados permitiram concluir que: a infecção de células trofoblásticas em explantes da membrana corioalantóidea por *B. abortus* promove supressão na expressão de genes pró-inflamatórios em células trofoblásticas, após 4 horas de infecção. A redução na expressão de genes relacionados a resposta imune e inflamação na célula trofoblástica pode estar associada a mecanismos de evasão da resposta imune inata induzidos por *B. abortus*.

CAPÍTULO 4

Expressão de citocinas e quimiocinas em células trofoblásticas bovinas durante infecção por *Brucella abortus*

INTRODUÇÃO

A imunidade inata contra *Brucella* tem o papel de controlar a infecção nos seus estágios iniciais auxiliando na geração de uma resposta imune adaptativa efetiva do hospedeiro. Além dos mecanismos de ação de células efetoras como macrófagos e células “natural killer” (NK), participam dessa resposta citocinas e quimiocinas com atuação importante sobre células e tecidos (Golding et al., 2001).

Os modelos murino de cultivo primário de células permitiram a identificação de algumas citocinas e quimiocinas que têm papel protetor durante a infecção por *B. abortus*. A produção de IL-12 foi observada em cultivos de monócitos humanos infectados (Zaitseva et al., 1996). Em outro estudo com monócitos humanos, foram detectadas, durante a infecção por *B. abortus*, a expressão de quimiocinas C-X-C e CC, como GRO α , IL-8, MIP-1 α e MIP 1- β , MCP-1, RANTES, além de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-6, TNF α e IL-10, porém esta expressão foi tardia em relação a indução destes genes nestas células após inoculação com *E. coli*. (Rittig et al., 2003). Da mesma forma, observou-se indução de TNF α e IL-12 em cultivos de macrófagos de camundongos infectados com *B. abortus* (Huang et al., 2003; Campos et al., 2004). Nestes trabalhos, os autores ressaltam a importância do reconhecimento do LPS da *Brucella* por receptores semelhantes à *toll* (TLRs) como determinantes de sinalização para expressão dessas citocinas e quimiocinas.

Os TLRs têm papel importante na resposta imune inata, sendo que membros da família TLR são expressos diferencialmente entre as células do hospedeiro e respondem de forma específica à diferentes estruturas moleculares conservadas dos microrganismos, conhecidas como PAMPs (do inglês, *pathogen associated molecular pattern*) (Duenas et al., 2004). Nesse contexto, o TLR4 está envolvido no reconhecimento de LPS bacteriano, sendo descrita como a molécula mais

importante no momento da infecção por *B. abortus* (Campos et al., 2004; Duenas et al., 2004). O LPS da *Brucella* destaca-se pela característica na sua composição estrutural distinta de outras bactérias Gram-negativas, como as enterobactérias, que possuem modelos clássicos de LPS que interagem com o receptor TLR4 determinando intensa resposta inflamatória no hospedeiro (Cardoso et al., 2006). Essa diferença no LPS de *B. abortus* não interfere na sua interação com TLR4, contudo, a resposta inflamatória do hospedeiro, resultante da sinalização por esta molécula, é bem menos intensa nas fases iniciais da infecção quando comparada à outros organismos. A molécula MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88) também tem papel importante na resposta imune inata durante a infecção por *B. abortus*, pois está envolvida na sinalização intracelular por TLR4, ativando o fator de transcrição NF- κ B, resultando na indução da transcrição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Huang et al., 2003; Weiss et al., 2005).

Estudos da placenta humana têm demonstrado a expressão de TLR2 e TLR4 em células trofoblásticas (Holmlund et al., 2002). Outros trabalhos sugerem que infecções intra-uterinas durante a gestação têm efeito direto em células trofoblásticas através da ativação do TLR4, que resulta na produção de citocinas pela célula trofoblástica em resposta a infecção (Abrahams et al., 2004). No bovino, ainda não são conhecidas moléculas de interação da placenta com *B. abortus*, embora ocorra intensa resposta inflamatória nesse tecido durante a infecção. De fato, na infecção natural de bovinos por *B. abortus*, uma das alterações anatomo-patológicas mais significativas é o processo inflamatório placentário, caracterizado por placentite necrotizante e supurada aguda com grande quantidade de *B. abortus* intralesional. Contudo, não são conhecidas as citocinas e/ou quimiocinas potencialmente envolvidas nesse processo. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar o perfil de citocinas e quimiocinas expressas por

células trofoblásticas bovinas em explantes da membrana cório-alantóideia (descritos no Capítulo 1) e pela placenta de bovinos em resposta a infecção *in vivo* por *B. abortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia de estudo do perfil de expressão de citocinas e quimiocinas em células trofoblásticas bovinas durante infecção por *B. abortus* envolveu a utilização dos explantes da membrana corioalantóideia bovina (descritos no Capítulo 2) e de amostras de placentomas procedentes de animais submetidos à infecção experimental. O protocolo de infecção experimental de vacas gestantes foi previamente descrito (Poester et al., 2006; Paixão et al., 2007).

O delineamento experimental da infecção *in vitro* consistiu na utilização de cinco placentas, sendo confeccionados 24 explantes controle (não infectados) e 24 explantes infectados de cada placenta. A infecção experimental foi feita com uma suspensão equivalente a $1,0 \times 10^7$ UFC da cepa de referência 2308 de *B. abortus*, em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Os explantes confeccionados das 5 placentas foram utilizados para infecção durante dois tempos: 6 e 12 horas. Os grupos controle nos dois tempos foram mantidos sob as mesmas condições de incubação com volumes equivalentes de meio de cultivo. Após as incubações nos diferentes tempos, as bactérias extracelulares foram inativadas incubando-se os explantes com meio RPMI 1640 contendo 50 µg/mL de gentamicina durante 1 hora, seguido de lavagens sucessivas das células trofoblásticas localizadas na superfície dos explantes, para remoção do antibiótico. O isolamento do RNA destas células foi realizado conforme descrito no capítulo 3.

O delineamento experimental da infecção *in vivo* incluiu a obtenção de amostras de placentomas de três grupos: um grupo de animais com bacteriologia negativa e gestação a termo com bezerro saudável (n=6); um grupo com bacteriologia positiva e gestação a termo (n=5) e o terceiro grupo com bacteriologia positiva e aborto (n=5). As amostras de placenta desses animais foram colhidas e imediatamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até a extração de RNA.

Fragmentos de placentomas destes mesmos animais foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas e processados pelo método rotineiro de inclusão em parafina, cortados a 4µm de espessura e corados pela hematoxilina e eosina para avaliação histológica, conforme descrito por Luna (1968).

Para determinação da expressão de citocinas e quimiocinas nas células trofoblásticas dos explantes de membrana corioalantóideia e nas amostras de placenta oriundas de vacas experimentalmente infectadas, foi realizada a extração do RNA total dos tecidos infectados por *B. abortus* e seus respectivos controles, utilizando-se Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante e descritas no Capítulo 3. As amostras de RNA obtidas foram aliqüotadas e armazenadas a -80°C.

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para a avaliação da expressão de citocinas e quimiocinas. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se um kit comercial (*Taqman reverse transcription reagent*; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), cujo protocolo encontra-se descrito resumidamente no Capítulo 3. Foram então realizadas as reações de PCR utilizando-se 2µg de cDNA, 600 nM de cada iniciador e 17 µL do reagente syber green (Applied Biosystems) em um volume final de 25µL de reação, no aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Foram avaliadas citocinas com atividade pró-inflamatória e quimiocinas que exercem quimiotaxia sobre neutrófilos. Os iniciadores específicos para cada uma das citocinas/quimiocinas foram delineados com base na seqüência do mRNA bovino (Tabela 4). As condições ótimas para a reação de PCR em tempo real, para os cDNAs a serem amplificados, foram determinadas em experimentos preliminares. Os resultados obtidos nos vários grupos foram comparados quantitativamente após normalização baseada na expressão de GAPDH bovino (número de acesso: NC_007303.2).

Tabela 4. Lista de genes e iniciadores para o RT-PCR em tempo real

Gene *	Iniciadores	Produto
GRO α	5'- CTATTTTGGGGAGAGGGTATTCC -3' 5'- CGTGACCTATCTGTTTGTGAACC -3'	94 nt
GRO γ	5'- GGATGGCTGTTCCAGAAGTAGACC -3' 5'- GGTGATTCCCTCTTTCCCTCTTTG -3'	64 nt
GCP-2	5'- ATTCATCCCAAACGGTCAGTG -3' 5'- CAGACTTCCCTTCCATTCTTCAAG -3'	101 nt
IL-8	5'- ACACATTCCACACCTTTCCACC -3' 5'- GCAGACCTCGTTTCCATTGGTAAG -3'	117 nt
IL-1 β	5'- TCCTCCGACGAGTTTCTGTGTG -3' 5'- GGGATTTTTGCTCTCTGTCTGG -3'	76 nt
IL-18	5'- GCTCTCCAATGCTTTCAGCG -3' 5'- AGCCATCTTTATGCCTGTGCTC -3'	147 nt
GAPDH	5'- ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACG -3' 5'- TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGGTC -3'	121 nt

* Quimiocinas com atividade quimiotática para neutrófilos - números de acesso: IL-8: AF232704/ NM173925/ U19947; GCP-2: AF149249; GRO- α : U95812; GRO- γ : U95811; citocinas com atividade pró-inflamatória - números de acesso: IL-18: AF124789/ AF173175/ NM174091; IL-1 β : NM174093).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta neutrofílica aguda observada na placenta bovina associada à infecção *in vivo* por *B. abortus* (Paixão, 2006), motivou a realização do estudo de avaliação da expressão de quimiocinas CXC com atividade quimiotática para neutrófilos (IL-8, GRO α , GRO γ , e GCP-2) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-18) em células do tecido placentário infectadas com *B. abortus*. Células epiteliais expressam quimiocinas CXC e, embora as duas citocinas pró-inflamatórias selecionadas nesse estudo sejam primariamente secretadas por fagócitos profissionais, elas foram mensuradas considerando que no explante da membrana cório-alantóidea e na placenta bovina, além das células trofoblásticas, residem outras populações celulares que podem incluir uma pequena, mas significativa população de linfócitos e macrófagos.

Os explantes da membrana corioalantóidea infectados com *B. abortus* apresentaram expressão de alguns mediadores pró-inflamatórios

às 12 horas, mas não às 6 horas após a infecção. Os explantes infectados foram comparados com o controle não infectado sob as mesmas condições de cultivo e tempo e calculadas as variações de expressão de cada grupo. Das quimiocinas avaliadas, GCP-2 e IL-8 apresentaram elevação significativa na expressão às 12 horas após a infecção em relação ao grupo submetido às 6 horas de infecção (diferença estatisticamente significativa nos valores de Ct normalizados, $p < 0.05$, Fig. 12). O aumento na expressão de GCP-2 e IL-8 indica provável papel dessas quimiocinas no recrutamento de neutrófilos para o tecido placentário bovino durante os estágios iniciais de infecção por *B. abortus*. Embora a resposta pró-inflamatória não seja tão intensa quanto as respostas desencadeadas por outras bactérias Gram-negativas em células epiteliais, estes dados dão suporte a hipótese de que as células trofoblásticas contribuem para o desencadeamento da patogênese da placente supurativa típica observada *in vivo* como resultado da infecção por *B. abortus* em vacas gestantes.

A expressão de IL-8 em células epiteliais foi demonstrada em modelos de infecção bacteriana tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta quimiocina é secretada por diferentes tipos celulares, incluindo-se células epiteliais. Estudos de infecção epitelial com bactérias como *Salmonella enterica* sorotipo Dublin, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae* demonstram a importância da produção de IL-8 na infecção aguda (Eckmann et al., 1993). Da mesma forma, a expressão de IL-8, GRO e GCP-2, também com sua atividade quimiotática para neutrófilos, ocorre a partir de 1 hora após a infecção com *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium em placas de Payer de

bezerros (Santos et al., 2002b). Considerando estes trabalhos publicados previamente, embora ocorra a indução de expressão destas quimiocinas (IL-8 e GCP-2) pelo trofoblasto bovino durante a infecção por *B. abortus*, a intensidade desta indução é menor, quando comparadas a indução por outras bactérias Gram-negativas epitélio-invasivas. A demora ou baixa intensidade de indução de moléculas pró-inflamatórias em células trofoblásticas infectadas com *B. abortus* é consistente com os resultados de microarranjo descritos no Capítulo 3, que também não detectou aumento de expressão destes genes 4 horas após a infecção.

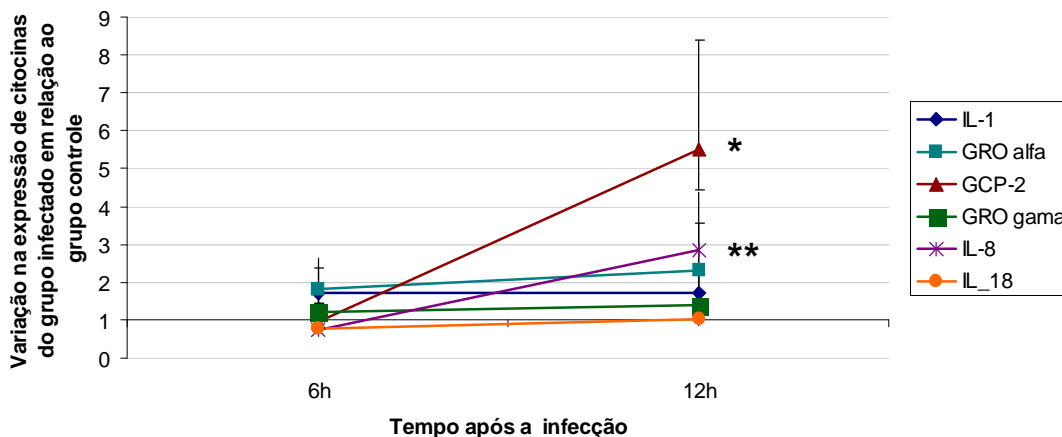


Figura 12. Quantificação da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias por RT-PCR em tempo real em trofoblastos de explantes da membrana corioalantóidea infectada com *Brucella abortus* às 6 e 12 horas após a infecção. Há diferença estatisticamente significativa entre os valores de *GCP-2 ($p=0.0172$) e ** IL-8 ($p=0.0184$), entre 6 e 12 horas após a infecção. As variações de expressão das citocinas avaliadas foram obtidas em relação aos respectivos grupos controle nos tempos estudados. Os pontos no gráfico se referem as médias geométricas e respectivos erros padrão.

Acredita-se que a placentite induzida pela *Brucella* é o principal fator causador do aborto na brucelose bovina. Contudo, esses resultados (Fig. 12) indicam uma resposta pró-inflamatória muito discreta das células trofoblásticas durante os estágios iniciais da infecção, quando comparada a estudos prévios em tecido intestinal bovino infectado por *Salmonella* (Santos et al., 2002b; Rafatellu et al., 2007). Este achado reflete o baixo poder de desencadeamento de

sinalização por TLR4 induzido pelo LPS de *Brucella*, em comparação com outras bactérias Gram-negativas (Duenas et al., 2004; Lapaque et al., 2006). Existem evidências de que alguns microrganismos dispõem de PAMPs alterados, ou seja moléculas de reconhecimento modificadas, que atuam como estratégia de escape da resposta imune inata como forma de sobrevivência na célula do hospedeiro (Janeway e Medzhitov, 2002). Um dos melhores exemplos

de estrutura com PAMPs alterado é o lipopolissacarídeo (LPS) da *Brucella*. O LPS da *Brucella*, como já descrito anteriormente, é classificado como não clássico por suas diferenças estruturais no lipídeo A, que interage com TLR4 (Lapaque et al., 2006). Contudo, essa sinalização induzida pela *Brucella* é eficiente apenas em elevadas concentrações de LPS, o que confere a *Brucella* maior resistência e a característica de ser um organismo fraco na ativação da resposta imune inata (Moreno et al., 1981; Rasool et al., 1992; Duenas et al., 2004). Essa característica, provavelmente foi determinante nos resultados obtidos durante a infecção de células trofoblásticas às quatro horas (descrito no Capítulo 3) e seis horas, quando *B. abortus* não induziu a expressão de fatores pró-inflamatórios pelas células trofoblásticas.

Em estudo recente, Barquero-Calvo et al. (2007) avaliaram a indução de resposta inflamatória por *B. abortus* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium em camundongos, pela indução de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) produzidas nos estágios iniciais de infecção. Seus resultados demonstraram níveis de citocinas produzidas por *B. abortus* considerados insignificantes. Quando os autores aumentaram a quantidade do inóculo de *B. abortus*, foi observada modesta elevação nos níveis de citocinas. Ao contrário da *Brucella*, a infecção com *S. Typhimurium* promoveu intensa indução de citocinas. Esses achados são compatíveis com os resultados observados no presente estudo.

Na avaliação histológica dos placentomos obtidos de vacas experimentalmente infectadas com *B. abortus* foi possível caracterizar lesões

decorrentes da infecção em todos os grupos estudados (Figuras 13 A, B e C). O grupo com bacteriologia positiva e gestação a termo apresentou infiltração neutrofilica intensa e difusa com áreas de necrose superficial e grumos bacterianos associados a hemorragia, caracterizando uma placentite necro-hemorrágica em placentomos de dois animais do grupo. Os três animais restantes apresentaram infiltrado inflamatório multifocal discreto a moderado, com necrose superficial em dois desses animais associada a restos fetais e áreas de mineralização. No grupo com bacteriologia positiva e manifestação de aborto, foi observado, em todos os animais avaliados, infiltrado inflamatório neutrofilico, acentuado e difuso, com extensas áreas de necrose superficial e profunda, grandes quantidades bactérias intralésionais e focos de hemorragia, que dependendo da intensidade e padrão da lesão determinou classificações como: placentite necro-hemorrágica (3/5), ou placentite necrótica (2/5). As lesões observadas no grupo que manifestou aborto foram bem mais intensas que as do grupo de gestação a termo, e podem ter associação com essa manifestação clínica da infecção. Contudo, animais infectados com exames bacteriológicos positivos, de alguma forma conseguem sustentar a gestação sem a manifestação do aborto, uma característica da infecção por *B. abortus*, descrita por Paixão (2006). Considerando que não são conhecidas as citocinas e/ou quimiocinas envolvidas nessas diferentes manifestações da infecção, a utilização da técnica de PCR em tempo real para determinação da expressão dessas moléculas nos placentomos, pode auxiliar no entendimento da interação *B. abortus* e placenta bovina.

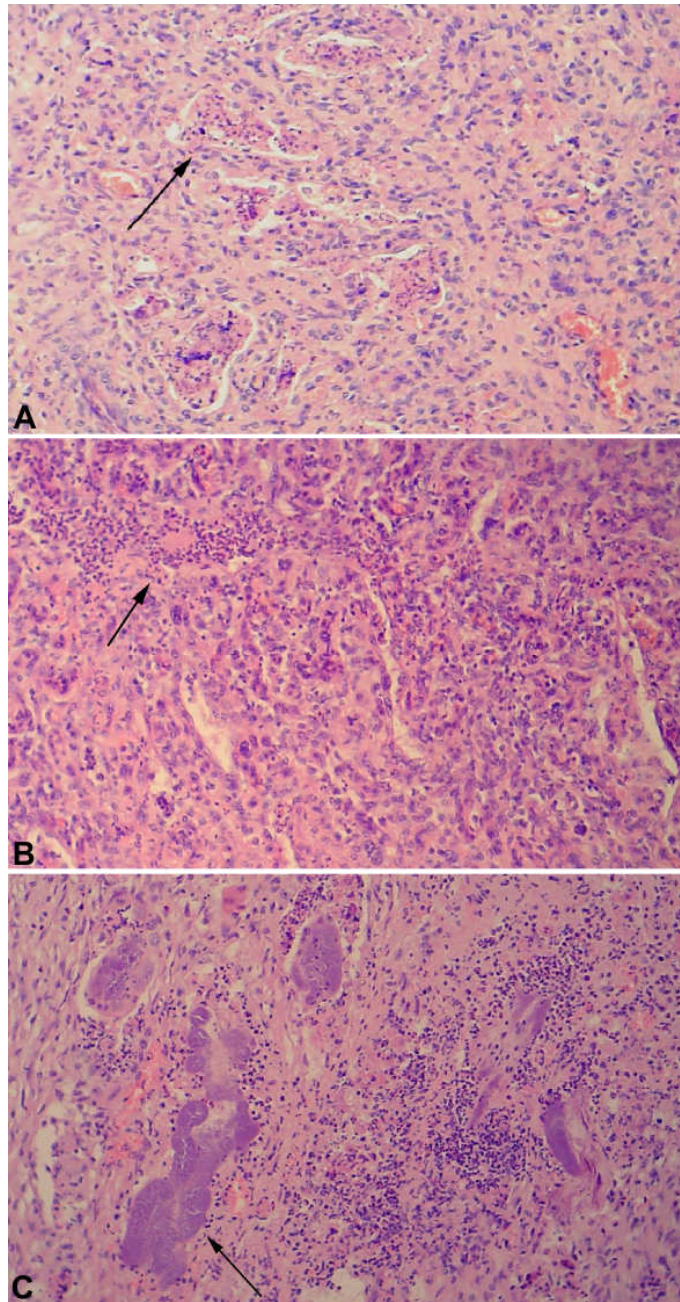


Figura 13. Carúncula bovina. A) Placenta após o parto sem alteração. Animal com bacteriologia negativa. Observam-se grupos de células da placenta fetal (vilosidade coriônica) envoltas por células da placenta materna das criptas carunculares (seta). B) Placentite necrótica moderada com infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal (seta), animal com bacteriologia positiva e gestação a termo. C) Placentite necro-hemorrágica acentuada com infiltrado neutrofílico intenso multifocal a coalescente e grande quantidade de bactérias intralaminares (seta). Animal com bacteriologia positiva e manifestação de aborto. HE.

As análises de PCR em tempo real das amostras de placentas de vacas experimentalmente infectadas indicaram aumento na expressão de duas das quimiocinas e uma citocina em comparação ao controle. No entanto, não foram

encontradas diferenças significativas de expressão entre o grupo com gestação a termo e o grupo com manifestação de aborto (Figura 14).

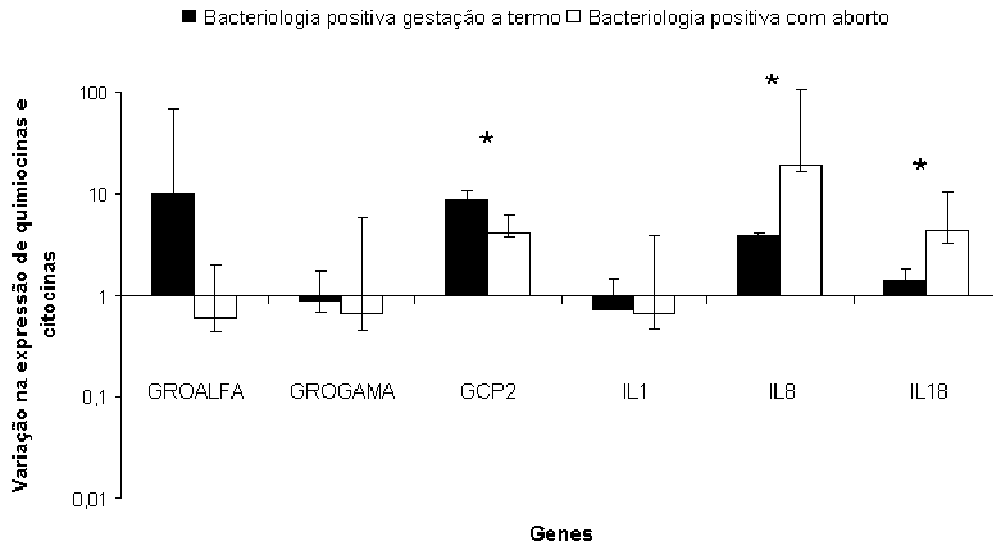


Figura 14. Expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias na placenta de bovinos infectados com *Brucella abortus* nos grupos com bacteriologia positiva e gestação a termo ou com bacteriologia positiva e aborto. As variações de expressão das citocinas avaliadas foram obtidas em relação aos respectivos controles dos grupos estudados. As colunas indicam médias e erro padrão, os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo controle (bacteriologia negativa) e os grupos com bacteriologia positiva com e sem aborto ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa entre o grupo com gestação a termo e o grupo que manifestou aborto ($p > 0,05$).

Na placenta bovina infectada com *B. abortus*, o perfil de expressão de citocinas é bastante semelhante ao observado na infecção do explante da membrana corioalantóideia, com magnitude de elevação na regulação, de aproximadamente 10 vezes. Cabe destacar que, a análise conjunta dos grupos com bacteriologia positiva, tanto com gestação à termo quanto com manifestação de aborto em comparação ao grupo controle com bacteriologia negativa, revelou maior expressão das quimiocinas IL-8 e GCP-2, além da citocina IL-18 ($p < 0,05$) (Fig. 14), à semelhança do que foi observado durante a infecção de células trofoblásticas *in vitro*. Provavelmente a expressão desses genes está relacionada ao processo inflamatório neutrofílico observado histologicamente (figuras 13 B e C). Entre os grupos com bacteriologia positiva não houve

diferença significativa de expressão. Embora sejam observadas diferenças histopatológicas nos processos inflamatórios dos grupos com bacteriologia positiva: gestação à termo e aborto, essas lesões são descritas como aleatórias (Paixão, 2006) e, portanto, podem não ter sido representativas das regiões de inflamação claramente observadas na histologia (considerando o tamanho do fragmento utilizado para extração de RNA), o que resultou na regulação de quimiocinas e citocinas semelhante estatisticamente. Contudo, o processo inflamatório é diferente do observado no grupo controle tanto na histologia quanto na expressão dos genes avaliados. Guardadas as proporções da infecção *in vivo* versus *ex vivo* e tecido versus explante, a resposta inflamatória observada no explante da placenta bovina reproduz a resposta

observada na infecção *in vivo*. Esses resultados dão suporte a aplicação do modelo explante no estudo da patogênese da infecção por *B. abortus* e ressaltam a importância do processo inflamatório induzido pela *Brucella* na patogênese da infecção.

A IL-18 também apresentou expressão aumentada nos dois grupos avaliados em comparação aos placentomas com bacteriologia negativa. Embora a expressão evidenciada de IL-18 não seja proveniente de trofoblastos, mas de macrófagos presentes na placenta, a atuação dessa citocina durante a infecção por *B. abortus* tem sido descrita em estudos com camundongos, como uma citocina importante para o controle da população de *B. abortus* no início da infecção, juntamente com IL-12 (Pasquali et al., 2002).

Os resultados em conjunto mostram que a infecção dos explantes da membrana corioalantóideia bovina com *B. abortus* causa elevação na expressão de quimiocinas (IL-8 e GCP-2) pela célula trofoblástica após 12 horas de infecção, não observada às 6 horas após a infecção. Na placenta de bovinos experimentalmente infectados a expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias é mais intensa em animais com bacteriologia positiva, ocorrendo tanto em animais com gestação a termo quanto em animais que abortaram.

CONCLUSÃO

A utilização do cultivo de explantes da membrana corioalantóideia bovina associada a metodologias para a avaliação da expressão gênica pelas células trofoblásticas, comprovou sua utilidade no estudo da patogênese de *B. abortus*. A análise conjunta dos resultados de microarranjo e PCR em tempo real dá suporte à hipótese de que a célula trofoblástica tem um papel importante na expressão de mediadores pró-inflamatórios com atividade conhecida de indução do influxo de neutrófilos. Essa resposta trofoblástica contribui para o entendimento da patogênese da placentite supurativa típica, observada *in vivo* como resultado da infecção por *B. abortus* em vacas gestantes. Portanto, as alterações no perfil de expressão gênica identificados no presente estudo, podem estar relacionados a placentite induzida por *Brucella*, reconhecida como fator importante para o desencadeamento do aborto. Contudo, os

resultados demonstram uma resposta inflamatória moderada e tardia induzida por *B. abortus*. A ausência de expressão e até mesmo redução da resposta pró-inflamatória nos estágios iniciais de infecção pode estar associada a um possível mecanismo de escape da resposta imune inata do hospedeiro por *B. abortus* na placenta bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.*, v. 173, p. 4286-4296, 2004.

ACKERMANN, M. R.; CHEVILLE, N. F.; DEYOE, B. L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Pathol.*, v. 25, p. 28-35, 1988.

ADAMS, L. G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 553-561, 2002.

ADAMS, L.G.; BARTHEL, R.; FENG, J.; QURESHI, T.; PIEDRAHITA, J.; TEMPLETON, J. W. Genes associated with innate killing of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* by macrophages from genetically resistant cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 54, p. 135, 1996.

ADAMS, L. G., TEMPLETON, J. W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, v.17, p. 200-219, 1998.

ALLAN, G.; CHAPPEL, R.; WILLIAMSON, P.; McNAUGHT, D. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg.*, v. 76, p. 287-298, 1976.

- ALLEN, C. A.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 1008-1016, 1998.
- ANDERSON, T. D., MEADOR, V. P., CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and Histologic Lesions. *Vet. Pathol.*, v. 23, p. 219-226, 1986a.
- ANDERSON, T. D.; MEADOR, V. P.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet. Pathol.*, v. 23, p. 227-239, 1986b.
- BARQUEIRO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D. S.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHACON-DIAZ, C.; RUCAVADO, A.; MORIYON, I.; MORENO, E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS*, v. 7, p. 631, 2007.
- BARTHEL, R., FENG, J., PIEDRAHITA, J. A., MCMURRAY, D. N., TEMPLETON, J. W., ADAMS, L. G.. Stable transfection of the bovine *Nramp1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 3110-3119, 2001.
- BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 37, p. 412-420, 1997.
- BEH, K. J. Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet. Sci.*, v. 17, p. 1-4, 1974.
- BIRMINGHAM, J. R.; JESKA, E. L. Characterization of macrophage functions in mice infected with *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 32, p. 1079-1083, 1981.
- BOSQHIROLI, M. L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; ALLARDET-SERVENT, A.; CAZEVIEILLE, C.; LAVIGNE, J. P.; LIAUTARD, J. P.; RAMUZ, M.; O'CALLAGHAN, D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 341-348, 2002.
- BRASIL, Secretaria de Defesa Animal, 2001. Instrução normativa n.2, 10 Jan. 2001. Diário Oficial, 4 Jun 2001. Seção 1, 26-31.
- BRASIL, Secretaria de Defesa Agropecuária, MAPA, 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. 88p.
- BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 435-446, 2002.
- BUNDLE, D. R.; CHERWONOGRODZKY, J.; CAROFF, M.; PERRY, M. B. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v. 138, p. 92-98, 1987.
- BUTLER, J.; SEAWRIGHT, G.; MCGIVERN, P.; GILSDORF, M. Preliminary evidence for a diagnostic immunoglobulin G1 antibody response among culture-positive cows vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenge exposed with strain 2308. *Am J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1258-1264, 1986.
- CAMPERO, C. M.; LADDS, P. W.; HOFFMANN, D.; DUFFIELD, B.; WATSON, D.; FORDYCE, G. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 24, n. 3, p.235-246, 1990.
- CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G.; SOWA, B. A. Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 41, p. 295-306, 1994.

- CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 34, p. 291-305, 1992.
- CAMPOS, M. A.; ROSINHA, G. M. S.; ALMEIDA, I. C.; SALGUEIRO, X. S.; JARVIS, B. W.; SPLITTER, G. A.; QURESHI, N.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Role of toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 1, p. 176-186, 2004.
- CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.*, v. 5, p. 1-13, 2006.
- CHAIN, P. S. G.; COMERCI, D. J.; TOLMASKY, M. E.; LARIMER, F. W.; MALFATTI, S. A.; VERGEZ, L. M.; AGUERO, F.; LAND, M. L.; UGALDE, R. A.; GARCIA, E. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 12, p. 8353-8361, 2005.
- CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; MÉRESSE, S.; DESJARDINS, M.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Activation of Rho and Rab GTPases dissociate *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol.*, v. 4, n. 10, p. 663-676, 2002.
- CHEVILLE, N. F.; STEVENS, M. G.; JENSEN, A. E.; TATUM, F. M.; HALLING, S. M. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, p. 1591-1597, 1993.
- COMERCI, D. J.; MARTINEZ-LORENZO, M. J.; SIEIRA, R.; GORVEL, J. P.; UGALDE, R. A. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol.*, v. 3, n. 3, p. 159-168, 2001.
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 3, p. 213-221, 1997.
- CORBEIL, L. B.; BLAU, K.; INZANA, T. J.; NIELSEN, K. H.; JACOBSON, R. H.; CORBEIL, R. R.; WINTER, A. J. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun.*, v. 56, p. 3251-3261, 1988.
- CORNER, L. A.; ALTON, G. G.; IYER, H. Distribution of *Brucella abortus* in infected cattle. *Aust. Vet. J.*, v. 64, p. 2963-2974, 1987.
- DELRUE, R. M.; MARTINEZ-LORENZO, M.; LESTRATE, P.; DANESE, I.; BIELARZ, V.; MERTENS, P.; DE BOLLE, X.; TIBOR, A.; GORVEL, J. P.; LETESSON, J. J. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell. Microbiol.*, v. 3, p. 487-497, 2001.
- DEL VECCHIO, V. G.; KAPATRAL, V.; ELZER, P.; PATRA, G.; MUJER, C. V. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 587-592, 2002a.
- DEL VECCHIO, V. G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R. J.; PATRA, G.; MUJER, C.; LOS, T.; IVANOVA, N.; ANDERSON, I.; BHATTACHARYYA, A.; LYKIDIS, A.; REZNIK, G.; JABLONSKI, L.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; MAZUR, M.; GOLTSMAN, E.; SELKOV, E.; ELZER, P. H.; HAGIUS, S.; O'CALLAGHAN, D.; LETESSON, J. J.; HASELKORN, R.; KYRPIDES, N.; OVERBEEK, R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 1, p. 443-448, 2002b.
- DETILLEUX, P. G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.*, v. 58, n. 7, p. 2320-2328, 1990a.
- DETILLEUX, P. G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet. Pathol.*, v. 27, p. 317-328, 1990b.

- DETILLEUX, P. G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in vero cells. *Am. J. Vet. Res.*, v. 52, n. 10, p. 1658-1664, 1991.
- DUENAS, A. I.; ORDUNA, A.; CRESPO, M. S.; GARCIA-RODRIGUEZ, C. Interaction of endotoxins with Toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella* spp. LPS. *Int. Immunol.* v. 16, p. 1467-1475, 2004.
- ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F.; FIERER, J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin 8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 8, p. 4569-4574, 1993.
- ELZER, P. H.; JACOBSON, R. H.; NIELSEN, K. H.; DOUGLAS, J. T.; WINTER, A. J. BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted polyclonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes. *Immunol. Lett.*, v. 42, p. 145-150, 1994.
- EMMINGER, A. C.; SCHALM, O. W. The effect of *Brucella abortus* on the bovine udder and its secretion. *Am. J. Vet. Res.*, v.4, p. 100-109, 1943.
- ENRIGHT, F. M.; WALKER, J. V.; JEFFERS, G.; DEYOE, B. L. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, p. 424-430, 1984.
- ENRIGHT, F. M.; SAMARTINO, L. Mechanism of abortion in *Brucella abortus* infected cattle. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.*, Virginia, p. 88-95, 1994.
- ESKRA, L.; MATHISON, A.; SPLITTER, G. Microarray analysis of mRNA levels from raw264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 1125-1133, 2003.
- EVERTS, R. E.; BAND, M. R.; LIU, Z. L.; KUMAR, C. G.; LIU, L.; LOOR, J. J.; OLIVEIRA, R.; LEWIN, H. A. A 7872 cDNA microarray and its use in bovine functional genomics. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 105, p. 235-245, 2005.
- EWALT, D. R.; PAYEUR, J. B.; RHYAN, J. C.; GEER, P. L. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological and histological study. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 09, p. 417-420, 1997.
- FICHT, T. A. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.*, v. 92, p. 213-223, 2003.
- FODOR, S. P.; RAVA, R. P.; HUANG, X. C.; PEASE, A. C.; HOLMES, C. P.; ADAMS, C. L. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, v. 364, n. 6437, p. 555-556, 1993.
- GAO, R.; MUKHOPADHYAY, A.; FANG, F.; LYNN, D. G. Constitutive activation of two-component response regulators: characterization of VirG Activation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, v. 188, n. 14. p. 5204-5211, 2006.
- GEE, J. M.; VALDERAS, M. W.; KOVACH, M. E.; GRIPPE, V. K.; ROBERTSON, G. T.; NG, W. L.; RICHARDSON, J. M.; WINKLER, M. E.; ROOP, R. M. The *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 05, p. 2873-2880, 2005.
- GIL, A. D.; SAMARTINO, L. E. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Food and Agriculture Organization, 2000.
- GODFROID, J.; KÄSBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 135-145, 2002.
- GOLDING, B.; SCOTT, D. E.; SCHARF, O.; HUANG, L. Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.*, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2001.

- GODSTEIN, J.; HOFFMAN, T.; FRASCH, C.; LIZZIO, E. F.; BEINING, P. R.; HOCHSTEIN, D.; LEE, Y. L.; ANGUS, R. D.; GOLDING, B. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as carrier in vaccines. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 1385-1389, 1992.
- GORHAM, S. L.; ENRIGHT, F. M.; SNIDER III, T. G.; ROBERTS, E. D. Morphologic lesions in *Brucella abortus* infected ovine fetuses. *Vet. Pathol.*, v. 23, n. 3, p. 331-332, 1986.
- GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 281-297, 2002.
- GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; VON EICHEL-STREIBER, C.; LÓPEZ-GOÑI, L.; THELESTAM, M.; ARVIDSON, S.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non professional phagocytes: direct activation of CDC42. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 44435-44443, 2001.
- GUZMAN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; PARRA, A.; CLOECKAERT, A.; GARIN, J.; GORVEL, J. P.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; LOPÉZ-GOÑI, L. The two-component system BvrR-BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of the outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rizhobiaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 19, p. 12375-12380, 2002.
- HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; ZUERNER, R. L.; QING, Z.; LI, L. L.; KAPUR, V.; ALT, D. P.; OLSEN, S. C. Completions of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, v. 187, n. 8, p. 2715-2726, 2005.
- HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Vet. J.*, v. 50, n. 3, p. 179-180, 1997.
- HOFFMANN, E. M.; HOULE, J. J. Contradictory holes for antibody and complement in the interection of *Brucella abortus* with its host. *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 21, p. 153-163, 1995.
- HOLMLUND, U.; CEBERS, G.; DAHLFORS, A. R.; SANDSTEDT, B.; BREMME, K.; EKSTROM, E. S.; SCHEYNIUS, A. Expression and regulation of the pattern recognition receptors toll-like receptor 4 in the human placenta. *Immunol.*, v. 107, p. 145, 2002.
- HONG, P. C.; TSOLIS, R. M.; FICHT, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 4102-4107, 2000.
- HONG, C. B.; DONAHUE, J. M.; GILES, R. C. J. R.; POONACHA, K. B.; TUTTLE, P. A.; CHEVILLE, N. F.; HONG, C. B.; DONAHUE, J. M. *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet. Pathol.*, v. 28, n. 6, p. 492-496, 1991.
- HUANG, L. Y.; ALIBERTI, J.; LEIFER, C. A.; SEGAL, D. M.; SHER, A.; GOLENBOCK, D. T.; GOLDING, B. Heat killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is toll-like receptor 2 dependent. *J. Immunol.* v. 1, p. 1441-1446, 2003.
- JANEWAY, C. A. The T cell receptor as multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 10, p. 645-674, 1992.
- JAYAPAL, M.; MELENDEZ, A. J. cDNA microarray technology for target identification and validation. *Clinic. Experiment. Pharmacol. Physiol.*, v. 33, p. 496-503, 2006.
- JIANG, X.; LEONARD, B.; BENSON, R.; BALDWIN, C. L. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol.*, v. 151, p. 309-319, 1993.
- JIANG, X.; BALDWIN, C. L. Effects of cytokines on intracelular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 124-134, 1993.

- JONES, S. M.; WINTER, A. J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 3011-3014, 1992.
- KELETI, G.; FEINGOLD, D. S.; YOUNGNER, J. S. Interferon inducing in mice by lipopolysaccharide from *Brucella abortus*. *Infect Immun.*, v. 10, p. 282-283, 1974.
- KENNEDY, P. C.; MILLER, R. B. *The female genital system*. In: JUBB, K.V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Pathology of Domestic Animals, 4ed. cap. 4, San Diego: Academic Press, 1993, p.484-489.
- KIM, Y. J.; KWAK, C. I.; GU, Y. Y.; HWANG, I. T.; CHUN, J. Y. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Biotechniques*, v. 36, n. 3, p.1-5, 2004.
- KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, n. 1, p. 65-78, 2003.
- KOPP, E. B.; MEDZHITOV, R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 11, p. 13-18, 1999.
- LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P. Controle da brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 47, p. 30-41, 2005.
- LAMB, V.; JONES, L.; SHURIG, G.; BERMAN, D. Enzyme linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, v. 26 p. 240-247, 1979.
- LAMBERT, G.; MANTHEI, C. A.; DEYOE, B. L. Studies on *Brucella abortus* infection in bulls. *Am. J. Vet. Res.*, v. 24, n. 103, p. 1153-1157, 1963.
- LAPAQUE, N.; TAKEUCHI, O.; CORRALES, F.; AKIRA, S.; MORIYON, I.; HOWARD, J. C.; GORVEL, J. P. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol.* v. 8, p. 401-413, 2006.
- LEAL-KLEVEZAS, D. S.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J. P. Molecular detection of *Brucella* spp: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Arch. Med. Res.*, v. 26, p. 263-267, 1995.
- LONDON, C. A.; ABBAS, A. K.; KELSO, A. Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 63, p. 37-44, 1998.
- LOPEZ, A.; HITOS, F.; PEREZ, A.; NAVARRO-FIERRO, R. R. Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. *Can. J. Comp. Med.*, v. 48, p. 275-277, 1984.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA LANDA, A.; MORIYÓN, I.; MORENO, E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 329-339, 2002.
- MANTHEI, C. A.; CARTER, R. W. Persistence of *Brucella abortus* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 11, p. 172-181, 1950.
- McCAUGHEY, W. J.; PURCELL, D. A. Brucellosis in bull. *Vet. Rec.*, v. 93, p. 336-337, 1973.
- MEADOR, V. P.; TABATABAI, L. B.; HAGEMOSER, W. A.; DEYOE, B. L. Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 2147-2150, 1986.
- MEADOR, V. P.; HAGEMOSER, W. A.; DEYOE, B. L. Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 2, p. 274-280, 1988.

- MEADOR, V. P.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Vet. Pathol.*, v. 26, n. 5, p. 357-368, 1989.
- MEADOR, V. P.; DEYOE, B. L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.*, v. 26, p. 513-515, 1989.
- MEDZHITOV, R. JR.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: the virtues of a monoclonal system of recognition. *Cell*, v. 91, p. 295-298, 1997.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature.*, v. 388, p. 394-397, 1997.
- MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. *J. Hyg. Comp.*, v. 38, p. 732-742, 1938.
- MORENO, E.; BERMAN, D. T.; BOETTCHER, L. A. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, v. 31, p. 362-370, 1981.
- MORENO, E.; MORIYÓN, I. The genus *Brucella*. In: Dworking, M., Falkow, S., Rosemberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. The Prokaryotes. Eletronic version. Springer, New York, 2001.
- MOSSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patherns of lyphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MUNSON, L.; CHANDLER, S. K.; SCHLAFER, D. H. Long-term culture of bovine trophoblastic cells. *J. Tiss. Cult. Method.*, v. 11, n. 3, p. 123-128, 1988.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v. 24, p. 69-95, 1980.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 447-459, 2002.
- NIELSEN, K. H.; EWALT, D. R. Bovine Brucellosis. In: Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 5 ed. Paris: Office international des Epizooties, p. 328-345, 2004.
- NIELSEN, K.; HECK, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella* by primary and secondary binding assays. *Prev. Vet. Med.*, v. 2, p. 197-204, 1984.
- O'CALLAGHAN, D., CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOSCHIROLI, M. L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKOV, Y.; RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens VirB* and *Bordetella pertussis Ptl* type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.*, v. 33, p. 1210-1220, 1999.
- OLIVEIRA, S. C.; HARMS, J. S.; RECH, E. L.; RODARTE, R. S.; BOCCA, A. L.; GOES, A. M.; SPLITTER, G. A. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 31, p. 77-84, 1998.
- OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. A. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 417-424, 2002.
- OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G. A. CD8+ type 1 CD44hi CD45Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucela abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, v. 25, p. 2551-2557, 1995.
- PAIXÃO, T. A. Resistência natural à brucelose bovina associada ao gene *NRAMP 1* Dissertação de mestrado, 90p. Belo Horizonte - UFMG, 2006.
- PAIXÃO, T. A., FERREIRA, C., BORGES, A. M., OLIVEIRA, D. A. A., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Frequency of bovine *Nramp1* (*Slc11a1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 109, p. 37-42, 2006.

- PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; CARVALHO NETA, A. V.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. NRAMP1 3'UTR polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 05, p. 2493-2499, 2007.
- PARSONS, K. R.; BLAND, A. P.; HALL, G. A. Follicle associated epithelium of the gut associated lymphoid tissue of cattle. *Vet. Pathol.*, v. 28, p. 22-29, 1991.
- PASQUALI, P.; ADONE, R.; GASBARRE, L. C.; PISTOIA, C.; CIUCHINI, F. Effect of exogenous interleukin-18 (IL-18) and IL-12 in course of *Brucella abortus* 2308 infection mice. *Clinic. Diag. Lab. Immunol.*, v. 9, n. 2, p. 491-492, 2002.
- PAULSEN, I. T.; SESHADRI, R.; NELSON, K. E.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, J. F.; READ, T. D.; DODSON, R. J.; UMYAM, L.; BRINKAC, L. M.; BEANAN, M. J.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; DURKIN, A. S.; KOLONAY, J. F.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; AKEN, S. E. V.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S. R.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; HOOVER, D. L.; LINDLER, L. E.; HALLING, S. M.; BOYLE, S. M.; FRASER, C. M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 20, p. 13148-13153, 2002.
- PAYNE, J. M. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 78, p. 447-463, 1959.
- PÉREZ J.; QUEZADA M.; LÓPEZ J.; CASQUET O.; SIERRA M.A.; MARTÍN DE LAS MULAS J. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.10, p. 17-21, 1998.
- PHILLIPS, M.; DEYOE, B. L.; CANNING, P. C. Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella* O-antigen. *Am J. Vet. Res.*, v. 50, p. 2158-2161, 1989.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; MEGE, J. L.; GORVEL, J. P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 2387-2392, 1998a.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MÉRESSE S.; PARTON, R. G.; VAN DER GOOT G.; SOLA-LANDA A.; LOPEZ-GONI I.; MORENO E.; GORVEL J. P. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.*, v. 66, n. 12, p. 5711-5724, 1998b.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; DESJARDINS, M.; MORENO, E.; AKIRA, S.; GORVEL, J. P. Modulation of endocytosis in nuclear factor IL6 (-/-) macrophages is responsible for high susceptibility to intracellular bacterial infection. *J. Immunol.*, v. 162, p. 3519-3526, 1999.
- PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. Review. *Microbes Infect.*, v. 2, n. 7, p. 829-835, 2000.
- POESTER, F. P., GONÇALVES, V. S. P., LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 55-62, 2002.
- POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 47, p. 13-29, 2005.
- POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L.; OLSEN, S. O.; SCHURIG, G. G.; LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v. 24, n. 25, p. 5327-5334, 2006.
- PORTE, F.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S. Early acidificação of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 4041-4047, 1999.

- QURESHI, T.; TEMPLETON, J. W.; ADAMS, L. G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella Dublin* and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 50, p. 55-65, 1996.
- RAFFATELLU, M.; SANTOS, R. L.; CHESSA, D.; WILSON, R. P.; WINTER, S.; BEVINS, C. L.; ADAMS, L. G.; BÄUMLER, A. J. The presence of the *viaB* locus reduces IL-17 and CXCL10 chemokine expression in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infect. Immun.*, v. 75, p. 4342-4350, 2007.
- RAJASHEKARA, G.; GLASNER, J. D.; GLOVER, D. A.; SPLITTER, G. A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.*, v. 186, n. 15, p. 5040-5051, 2004.
- RAMÍRES-ROMERO, R. Is *Brucella abortus* a facultative intracellular pathogen mitochondria-like activity? *Medic. Hypothes.*, v. 51, p. 41-45, 1998.
- RANKIN, J. E. F. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. *Vet. Rec.*, v. 77, p. 132-135, 1965.
- RASOOL, O.; FREER, E.; MORENO, E.; JARSTRAND, C. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 1699-1702, 1992.
- RICHMOND, J. Y.; MCKINNEY, R. W. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 3 ed. Washington: National Institutes of Health/Centers for disease control and prevention. p. 85-86, 1993.
- RITTIG, M. G.; KAUFMANN, A.; ROBINS, A.; SHAW, B.; SPRENGER, H.; GEMSA, D.; FOULONGNE, V.; ROUOT, B.; DORNAND, J. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J. Leuk. Biol.*, v. 74, p. 1045-1055, 2003.
- ROCK, F. L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 588-593, 1998.
- ROGERS, R. J.; COOK, D. R.; KETTLERER, P. J.; BALDOCK, F. C.; BLACHALL, P. J.; STEWART, S. W. An Evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. *Aust. Vet. J.*, v. 66, p. 77-80, 1989.
- ROLÁN, H. G.; TSOLIS, R. M. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus virB* mutant colonization. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 6, p. 2965-2973, 2007.
- ROUX, C. M.; ROLÁN, H. G.; SANTOS R. L.; BEREMAND, P. D.; THOMAS, T. L.; ADAMS, L. G.; TSOLIS, R. M. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cell. Microbiol.* v. 9, p. 1851-1869, 2007.
- SALMERON, I.; RODRIGUE-ZAPATA, M.; SALMERON, O.; MANZANO, L.; VAQUER, S.; ALVAREZ-MON, M. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 15, p. 764-770, 1992.
- SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n.3, p. 359-363, 1992.
- SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 16, n. 2, p. 95-101, 1993.
- SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 19, p. 55-63, 1996.
- SAMARTINO, L. E.; TRAU, R. E.; ENRIGHT, F. M. Invasion and replication of *Brucella abortus* in three different trophoblastic cell lines. *Zentralbl. Veterinar. Med. B.*, v. 41, n. 4, p. 229-236, 1994.

- SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 19, n. 1, p. 55-63, 1996.
- SÁNCHEZ, D. O.; ZANDOMENI, R. O.; CRAVERO, S.; VERDÚN, R. E.; PIERROU, E.; FACCIO, P.; DIAZ, G.; LANZAVECCHIA, S.; AGUERO, F.; FRASCH, A. C. C.; ANDERSSON, S. G. E.; ROSSETI, O. L.; GRAU, O.; UGALDE, R. A. Gene discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 02, p. 865-868, 2001.
- SANGARI, F. J.; AGUERO, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity an update. *Microbiologia*, v. 12, p. 207-218, 1996.
- SANTOS, R. L.; BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; ANDRADE, J. S. Erythrophagocytosis in caprine trophoblast. *Theriogenology*, v. 46, n. 6, p. 1077-1083, 1996.
- SANTOS, R. L.; PEIXOTO, M. T. D.; SERAKIDES, R.; COSTA, G. M.; MARTINS, N. E. Detección de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa en el testículo y en el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch.Reprod. Anim.*, n. 6, p. 34-41, 1998.
- SANTOS, R. L.; SCHOFFELMEER, J. A.; TSOLIS, R. M.; GUTIÉRREZ-PABELLO, J. A.; BAUMLER, A. J.; ADAMS, L. G. *Salmonella* serotype Typhimurium infection of bovine Peyer's patches down-regulates plasma membrane calcium-transporting ATPase expression. *J. Infect. Dis.*, v. 186: p. 372-378, 2002.
- SANTOS, R. L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R. M.; BAUMLER, A. J.; ADAMS, L. G. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* in neonatal calves. *Vet. Pathol.*, v. 39, p. 200-215, 2002b.
- SANTOS, R. L.; SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; SAMARTINO, L. E. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 47, p. 83-98, 2005.
- SAURET, J. M.; VILISSOVA, N. Human brucellosis. Review. *J. Am. Board. Fam. Pract.*, v. 15, n. 5, p. 401-406, 2002.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, v. 270, p. 467-470, 1995.
- SCHURIG, G. G.; ROOP, R. M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v. 28, p. 171-188, 1991.
- SIEIRA, R.; COMERCI, D. J.; SANCHEZ, D. O.; UGALDE, R. A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.*, v. 182, n. 17, p. 849-855, 2000.
- SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 47, p. 1-12, 2005.
- SIMÕES, R.; FERREIRA, R. C. Entraves comerciais às exportações de carne bovina. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 21, p. 23-29, 2000.
- SOLA- LANDA, A.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GRILÓ, M. J.; MORENO, E.; MORIYÓN, I.; BLASCO, J. M.; GORVEL, J. P.; LÓPEZ-GOÑI, I. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.*, v. 29, n. 01, p. 125-138, 1998.
- SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S. C.; CAREY, M.; MILLER, C.; KO, J.; COVERT, J. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 54, p. 309-319, 1996.
- STEVENS, M. G.; PUGH Jr., G. W.; TABATABAI, L. B. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 4407-4409, 1992.

- STEVENS, M. G.; OLSEN, S. C.; PUGH, G. W.; PALMER, M. V. Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect. Immun.* v. 62, p. 3206-3212, 1994.
- SUN, Y. H.; DEN HARTIGH, A. B.; SANTOS, R. L.; ADAMS, L. G.; TSOLIS, R. M. Vir-B mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or macrophage NADPH oxidase in macrophages. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 4826-4832, 2002.
- TEIXEIRA, P.; VALLE, S. Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Fiocruz-RJ. 362p., 1996.
- TRICHARD, C. J.; HERR, S.; BASTIANELLO, S. S.; ROUX, D. Unilateral orchitis in a bull caused by *Brucella abortus* biotype 1. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 53, n.1, p. 60-62, 1982.
- TRUJILLO, I. Z.; ZAVALA, A. N.; CACERES, J. G.; MIRANDA C. Q. Brucellosis Infection. *Dis. Clin. North Am.*, v. 8, p. 225-241, 1994.
- TSOLIS, R. M. Comparative genome analysis of the α -proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 20, p. 12503-12505, 2002.
- TUMURKHUU, G.; KOIDE, N.; TAKAHASHI, K.; HASSAN, F.; ISLAM, H.; MORI, I.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. Characterization of biological activities of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide. *Microbiol. Immunol.*, v. 50, n. 6, p. 421-427, 2006.
- UGALD, R. A. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect.*, v. 1, p. 1211-1219, 1999.
- USHIZAWA, K.; HERATH, C. B.; KANEYAMA, K.; SHIOJIMA, S.; HIRASAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; OCHIAI, K.; TOKUNAGA, T.; TSUNODA, Y.; TSUJIMOTO, G.; HASHIZUME, K. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 2, p. 77, 2004.
- USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; KANEYAMA, K.; TOKUNAGA, T.; TSUNODA, Y.; HASHIZUME, K. Gene expression profiles of bovine trophoblastic cell line (BT-1) analysed by a custom cDNA microarray. *J. Reprod. Dev.*, v. 51, n. 2, p. 211-220, 2005.
- USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; HOSOE, M.; ISHIWATA, H.; KANEYAMA, K.; KIZAKI, K.; HASHIZUME, K. Global gene expression analysis and regulation of the principal genes expressed in bovine placenta in relation to transcription factor AP-2 family. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 5, p. 17, 2007.
- VERGER, J. M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 35, p. 292-295, 1985.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. *Science*, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.
- VERGER, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A.; GRAYON, M. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol.*, v. 138, p. 235-238, 1987.
- WANG, M.; QURESHI, N.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. *Microb. Pathol.*, v. 31, n. 5, p. 221-230, 2001.
- WATERMAN-STORER, C. M.; WORTHYLAKE, R. A.; LIU, B. P.; BURRIDGE, K.; SALMON, E. D. Microtubule growth activates Rac 1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat. Cell Biol.*, v. 1, p. 45-50, 1999.
- WEISS, D. S.; RAUPACH, B.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A. toll like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.*, v. 172, p. 4463-4469, 2004.

- WEISS, D. S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A.; MORENO, E. MyD88, but not Toll like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 5137-5143, 2005.
- WEST, A. H.; STOCK, A. M. Histidine Kinases and responses regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.*, v. 26, p. 369-376, 2001.
- WHITESIDE, E. J.; KAN, M.; JACKSON, M. M.; THOMPSON, J. G.; McNAUGHTON, C.; HERINGTON, A. C.; HARVEY, M. B. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and activity during early embryo development in the cow. *Anat. Embryol.*, v. 204, p. 477-483, 2001.
- WILESMITH, J. W. The persistence of *Brucella abortus* in calves: a retrospective study of heavily infected herds. *Vet. Rec.*, v. 103, p. 149-153, 1978.
- WILLIAMS, A. E.; KEPPIE, J.; SMITH, H. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. III. Foetal erythritol a cause of the localization of *Brucella abortus* in pregnant cows. *Br. J. Exp. Pathol.*, v. 43, p. 530-537, 1962.
- WILSON, H. L.; AICH, P.; ROCHE, F. M.; JALAL, S.; HODGSON, P. D.; BRINKMAN, F. S. L.; POTTER, A. BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. J. Molecular analyses of disease pathogenesis: Application of bovine microarrays. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 105, p. 277-287, 2005.
- WYCKOFF III, JH. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 395-415, 2002.
- YOUNG, E. J. Human brucellosis. *Rev. Infect. Dis.*, v. 5, p. 821-842, 1983.
- ZAITSEVA, M.; GOLDING, H.; MANISCHEWITZ, J.; WEBB, D.; GOLDING, B. *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: introduction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intracellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 3109-3119, 1996.
- ZHAN, Y.; YANG, J. L., CHEERS, C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 7, p. 2841-2847, 1993.
- ZHAN, Y.; LIU, Z.; CHEERS, C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 2782-2786, 1996.
- ZHAN, Y. F.; STANLEY, E. R.; CHEERS, C. Prophylaxis or treatment of experimental brucellosis with interleukin-1. *Infect. Immun.*, v. 59, p. 1790-1794, 1991.
- XIANG, Z.; ZHENG, W.; HE, Y. BBP: *Brucella* genome annotation with literature mining and curation. *BMC Bioinform.*, v. 347, n. 7, p. 1-14, 2006.