

Tatiane Alves da Paixão

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DE POLIMORFISMOS
DO NRAMP1 NA RESISTÊNCIA À BRUCELOSE BOVINA**

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre.
Curso de Mestrado em Medicina Veterinária
Área de Concentração: Patologia Veterinária
Orientador: Renato de Lima Santos

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2006

Dissertação defendida e aprovada em 31 de janeiro de 2006, pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Renato de Lima Santos
(Orientador)

Prof. Sérgio Costa Oliveira

Prof. Isabella Bias Fortes Ferraz

Prof. Andrey Pereira Lage

Aos meus pais a quem devo tudo que sou e
Ao Marcus pelo amor e apoio incondicionais.

“A mente que se abre para uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Eistein

Agradecimentos

Deus, obrigado por sempre acompanhar meus passos.

Ao Prof. Renato de Lima Santos por quem tenho além da gratidão pela orientação, ensinamentos e confiança; também admiração por ser um exemplo de profissional.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage pela parceria e por abrir as portas do seu laboratório, imprescindíveis para o sucesso deste trabalho.

Ao Prof. Alan Maia Borges, responsável pela padronização da técnica, pelas suas instruções tão valiosas nos primeiros passos.

A Profa. Denise Oliveira por disponibilizar o Laboratório de Genética da Escola de veterinária da UFMG e por fornecer grande parte das amostras utilizadas no projeto.

Ao Fernando Poester pela sua importante participação na realização de várias etapas do projeto.

Aos ex-alunos de iniciação científica, Cíntia Ferreira e Bruno Reis pela ajuda valiosa na execução do projeto.

Aos professores, Ernane Fagundes, Rogéria Serakides, Roberto Guedes e mais recente, mas não menos importante Roselene Ecco pelos ensinamentos fundamentais para minha formação.

À Mel e a Marilene não só pela ajuda como técnicas, mas principalmente pelo carinho e boas conversas no laboratório. E ao Adão por me ajudar sempre com muita boa vontade.

Aos Colegas do setor de patologia (e agregados), Edmilson, Fabiana, Regina, Taismara, Natália, Andréa, Soraia, Carol, Eveline, Renatinha, Antônio, Mariana, Isabela e Raquel alguns pela ajuda, outros pelas risadas ou apenas pela companhia que tornaram menos árduo este período. Em especial para Alcina e Sílvia pela amizade, compreensão, e disposição em ajudar independente de dia, hora ou lugar.

As garotas do laboratório do Andrey principalmente, Ana Cláudia, Telma e Karina tanto pela ajuda quanto pelos momentos agradáveis.

Aos meus irmãos, Richard e Diogo, parentes e amigos que sempre acompanharam e torceram pelo meu sucesso. Às minhas sobrinhas Ana Luisa, Mariana e mais nova da família, Maria Eduarda que são as minhas alegrias.

Ao Laboratório de Apoio Animal – LARA, Pedro Leopoldo/MG por ter cedido área experimental e participado intensamente no desenvolvimento do experimento.

Ao laboratório de Genética Animal – GENEALÓGICA, Belo Horizonte/MG por ter cedido parte das amostras utilizadas no projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela Bolsa de estudo concedida.

SUMÁRIO

	RESUMO	13
	ABSTRACT	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	CAPÍTULO 1: BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	
2.1	BRUCELOSE BOVINA	17
2.2	PATOGÊNESE DA <i>BRUCELLA ABORTUS</i>	20
2.3	RESISTÊNCIA NATURAL E O GENE <i>NRAMP1</i>	21
2.4	RESISTÊNCIA NATURAL À BRUCELOSE BOVINA E O GENE <i>NRAMP1</i>	23
3	CAPÍTULO 2: FREQUÊNCIA DOS ALELOS DA 3'UTR DO GENE <i>NRAMP1</i> EM DIFERENTES RAÇAS BOVINAS	
3.1	INTRODUÇÃO	26
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.4	CONCLUSÃO	30
4	CAPÍTULO 3: CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DA 3'UTR DO GENE <i>NRAMP1</i> BOVINO E A OCORRÊNCIA DE ABORTO, ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO FETO E DA VACA DURANTE INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Brucella abortus</i>.	
4.1	INTRODUÇÃO	31
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.4	CONCLUSÃO	53
5	CAPÍTULO 4: CORRELAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO NATURAL POR <i>Brucella abortus</i> E OS POLIMORFISMOS DA 3'UTR DO GENE <i>NRAMP1</i>.	
5.1	INTRODUÇÃO	54
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	54
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.4	CONCLUSÃO	59
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7	ANEXOS	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos genótipos das vacas nos grupos experimentais.	33
Tabela 2	Número de vacas que abortaram e que pariram por grupo experimental.	34
Tabela 3	Frequência de aborto e nascimento de bezerros fracos segundo o genótipo em vacas gestantes experimentalmente infectadas com <i>B. abortus</i> .	34
Tabela 4	Escore médio das lesões histopatológicas nas vacas dos grupos B19, RB51 e NV, subdivididas segundo o genótipo.	46
Tabela 5	Escore médio das lesões histopatológicas nos fetos das vacas dos grupos B19, RB51 e NV, subdivididos segundo o genótipo da vaca.	47
Tabela 6	Escore médio das lesões histopatológicas nas vacas dos grupos experimentais	48
Tabela 7	Escore médio das lesões histopatológicas dos órgãos dos fetos dos grupos experimentais.	48
Tabela 8	Escore médio das lesões histopatológicas nas vacas dos grupos com genótipo resistente e susceptível.	49
Tabela 9	Escore médio das lesões histopatológicas nos fetos segundo o genótipo das vacas.	49
Tabela 10	Frequência de ausência de lesões histopatológicas em diferentes órgãos das vacas com genótipo resistente e susceptível.	50
Tabela 11	Frequência de ausência de lesões histopatológicas em diferentes órgãos dos fetos conforme o genótipo das vacas.	51
Tabela 12	Associação dos fenótipos resistente e susceptível com os alelos do gene <i>Nramp1</i> .	52
Tabela 13	Tipificação das amostras isoladas dos <i>swabs</i> vaginais.	55
Tabela 14	Correlação entre frequência de sorologia negativa ou positiva com a frequência dos diferentes alelos do gene <i>Nramp1</i> .	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Ocorrência de parto ou aborto nos grupos experimentais (Capítulo 3)	73
Anexo 2	Genotipagem e sorologia - Brucelose a campo (Capítulo 4)	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resultado representativo do SSCA para identificação dos alelos do gene <i>Nramp1</i> . As setas indicam produtos do tamanho 175, 177 e 179 pares de base correspondendo a GT13, GT14 e GT15, respectivamente.	28
Figura 2	Distribuição da frequência dos genótipos do gene <i>Nramp1</i> em animais da raça Holandesa e de raças zebuínas. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as raças (P=0,001).	29
Figura 3	Distribuição da frequência dos genótipos do gene <i>Nramp1</i> nas raças Gir, Guzerá, Nelore. Letras diferentes em um mesmo genótipo diferem estatisticamente entre si (P<0,05).	29
Figura 4	Vaca. Útero repleto com grande quantidade de exsudato amarelo-amarronzado e superfícies carunculares necróticas.	37
Figura 5	Vaca. Útero contendo exsudato amarronzado com material necrótico floculento amarelado no lume e recobrindo a superfície caruncular.	37
Figura 6	Vaca. Corte sagital da carúncula. Hemorragia intensa e difusa na carúncula	37
Figura 7	Vaca. Corte sagital da carúncula. Superfície caruncular recoberta por material necrótico e com anexos fetais ainda aderidos.	37
Figura 8	Piquete do experimento. Feto abortado em terço final de gestação em avançado estado de autólise.	39
Figura 9	Feto. Pleurite fibrinosa. Pleura parietal e visceral hemorrágicas e recobertas por material fibrinoso.	39
Figura 10	Feto. Pleurite fibrinosa. Pleura visceral recoberta por fibrina e pequena quantidade de líquido avermelhado na cavidade torácica.	39
Figura 11	Feto. Pleurite e pericardite fibrinosa. Saco pericárdio repleto de fibrina e focos de hemorragia do epicárdio. Pleura parietal com hiperemia e hemorrágica e a capa de fibrina que recobria a pleura visceral foi retirada.	39
Figura 12	Vaca. Carúncula. Placentite necrótica intensa. Criptas carunculares com material necrótico, hemorragia multifocal, infiltrado inflamatório intenso e grande quantidade de grumos bacterianos de <i>Brucella abortus</i> demonstrado por imunistoquímica anti- <i>B. abortus</i> (detalhe). HE, Barra = 167µm	41
Figura 13	Vaca. Glândula mamária. Mastite mista intensa multifocal. Intenso infiltrado de linfócitos, macrófagos e neutrófilos no interstício e acúmulo de neutrófilos no lume de alguns ductos. Algumas células inflamatórias contêm bactérias intracitoplasmáticas marcadas pela imunistoquímica anti <i>B. abortus</i> (detalhe). HE. Barra = 50µm	41
Figura 14	Vaca. Endométrio. Endometrite intensa. Extensa área de erosão do epitélio endometrial com acúmulo de grande quantidade de exsudato com restos celulares e grumos bacterianos. Infiltrado inflamatório difuso e intenso na submucosa. HE. Barra = 250µm	41
Figura 15	Vaca. Endométrio. Vasculite. Degeneração fibrinóide da parede da arteríola associada a infiltrado inflamatório intenso mural e perivascular. HE. Barra = 100µm	41
Figura 16	Vaca. Linfonodo supramamário. Linfadenite supurada moderada multifocal associada a reticulocitose. Seios medulares repletos de macrófagos volumosos e com múltiplos focos de neutrofilos. HE. Barra = 33,5µm	41
Figura 17	Feto. Pulmão. Pleurite supurada intensa. Espessamento e hiperemia da pleura associados a infiltrado neutrofilico intenso e difuso. HE. Barra = 100µm	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 18	Bezerro. Pulmão. Pneumonia intersticial multifocal. Espessamento acentuado da parede alveolar com grande quantidade de neutrófilos HE. Barra = 33,5µm	43
Figura 19	Bezerro. Pulmão. Broncopneumonia. Bronquíolo repleto de fibrina. Hiperemia e focos discretos de células inflamatórias no parênquima pulmonar. He. Barra = 80µm	43
Figura 20	Feto. Pulmão. Atelectasia total. Inúmeras bactérias <i>Brucella abortus</i> intracelulares e extracelulares. Imunoistoquímica anti- <i>B. abortus</i> . Barra = 25µm	43
Figura 21	Resultado representativo do SSCA para identificação dos alelos do gene <i>Nramp1</i> . As setas indicam produtos do tamanho 175 e 177 pares de base correspondendo a GT13, GT14 respectivamente.	57
Figura 22	Correlação entre a frequência do genótipo resistente (SSCA ^r) com os diferentes títulos sorológicos observados no 2-ME. Não houve diferença significativa entre os grupos (P>0,05).	58

RESUMO

Brucelose é uma doença reprodutiva de bovinos, economicamente importante, caracterizada por aborto no terço final de gestação. A resistência natural contra patógenos intracelulares, como *Brucella abortus*, tem sido associada ao gene *Nramp1* em camundongos, bovinos e no homem. O gene *Nramp1* codifica uma proteína transportadora de cátions divalentes expressa na membrana de fagolisossomos de macrófagos. Em camundongos, o *Nramp1* tem um papel importante na imunidade inata, pois favorece o controle do crescimento bacteriano pelos macrófagos na fase inicial da infecção e ainda influencia na imunidade adquirida. A resistência natural à brucelose nos bovinos está associada ao polimorfismo da região não-traduzida da extremidade 3' (3'UTR) do gene *Nramp1*, visualizado pela *single strand conformational analysis* (SSCA). Este estudo comparou a frequência dos polimorfismos da 3'UTR do gene *Nramp1* bovino entre raças zebuínas (Gir, Guzerá e Nelore) e a raça Holandesa. Também foi estudada a associação entre polimorfismo da 3'UTR e resistência natural à infecção experimental e natural por *Brucella abortus*. Foram observadas diferenças marcantes na frequência dos alelos do *Nramp1* entre raças zebuínas e a raça Holandesa ($p < 0,001$). Não houve associação entre o alelo resistente do gene *Nramp1* e o fenótipo resistente à brucelose nem na infecção experimental e nem a campo. Estes resultados indicam que o polimorfismo da 3'UTR do *Nramp1* não pode ser utilizado como um marcador de resistência natural contra brucelose bovina.

ABSTRACT

Brucellosis is an economically important reproductive disease of cattle characterized by abortion during the last trimester of gestation. The natural resistance against intracellular pathogens, like *Brucella abortus*, has been associated to the *Nramp1* gene in mice, human, and cattle. The *Nramp1* gene encodes a divalent cation transporter that is located in the phagolysosome membrane in macrophages. The *Nramp1* in mice plays an important role in innate immunity, favouring the control of bacterial growth by macrophages during the early phase of infection. In addition, *Nramp1* influences the adaptive immunity. In cattle, natural resistance against brucellosis is associated with polymorphisms at the 3'untranslated region (3'UTR) *Nramp1* gene, which are detectable by single strand conformational analysis (SSCA). This study compared the frequency of the *Nramp1* 3'UTR polymorphisms between Brazilian Zebu breeds (Gir, Guzará, and Nelore) and Holsteins. It was also studied the association between *Nramp1* 3'UTR polymorphisms and natural resistance against brucellosis in experimental and natural infections by *Brucella abortus*. A marked difference in the frequency of alleles was detected between the zebu and Holstein cattle ($p < 0.001$). No association was found between the *Nramp1* resistant allele and the resistant phenotype neither in experimental nor in naturally-occurring brucellosis. These results imply that *Nramp1* 3'UTR polymorphisms cannot be used as marker of natural resistance against bovine brucellosis.

Introdução

O controle de doenças infecciosas, como a brucelose bovina, é uma preocupação em todo o mundo, tanto pelo risco de saúde pública devido ao seu potencial zoonótico quanto pelos prejuízos econômicos acarretados ao sistema de produção. Apesar de ser controlada em alguns países do hemisfério norte (Godfroid e Kasbohrer, 2002), a brucelose bovina continua sendo uma zoonose importante de distribuição mundial. No Brasil, existe variação muito significativa da sua prevalência em diferentes regiões do país, mas a prevalência geral é de aproximadamente 5% (Poester et al., 2002), em uma população bovina estimada em 195 milhões de cabeças (IBGE, 2003). O impacto econômico da brucelose bovina no Brasil resulta em perdas anuais de 32 milhões de dólares, conforme estimativas da década de setenta (Poester et al., 2002).

A brucelose bovina é causada pela *Brucella abortus* e se caracteriza clinicamente principalmente pela ocorrência de aborto no terço final de gestação (Enright et al., 1984). Como consequência, observa-se queda na produção de leite e redução da fertilidade (Gorham et al., 1986; Meador et al., 1989), resultando em grandes perdas econômicas ao produtor, além dos custos com o controle e prevenção da doença (Nicoletti, 1980). No homem, a brucelose manifesta-se por sinais sistêmicos inespecíficos como febre, anorexia, emagrecimento e pode causar artrite, meningite, endocardites e acometer diversos outros órgãos, podendo ser fatal (revisado por Sauret e Vilissova, 2002 e Santos et al., 2005). A ocorrência de brucelose humana por *B. abortus* está diretamente relacionada com o contato com animais portadores, seja na linha de abate ou pelo contato com restos placentários e feto abortado no campo. Nos países onde a doença nos animais domésticos foi controlada ou mesmo erradicada, houve diminuição acentuada do número de casos humanos (Gil e Samartino, 2000). Por esta

razão, a incidência da brucelose no homem é influenciada diretamente pela incidência da doença nos animais domésticos (Nicoletti, 1980) e sua erradicação depende do controle da brucelose nos animais (Ko e Splitter, 2003).

A resposta do bovino à brucelose envolve a imunidade inata e a adquirida. A resposta imune efetiva à infecção por *B. abortus* nos bovinos é a imunidade celular adquirida (Splitter et al., 1996; Oliveira et al., 2002). Porém, a imunidade inata é responsável tanto pela diminuição do número inicial de bactérias quanto pelo melhor desenvolvimento da imunidade adquirida (Ko e Splitter, 2003). Outro aspecto importante na imunidade inata nos bovinos é a resistência natural contra a brucelose, caracterizada pela capacidade de um animal resistir à doença sem exposição prévia ao agente ou imunização. A resistência natural está relacionada com vários fatores sendo o caráter hereditário um componente importante (Adams e Templeton, 1998). Através da seleção genética, sabe-se que dois ou mais genes estão envolvidos no controle da resistência natural a brucelose e que a frequência de um genótipo resistente pode ser aumentada por cruzamentos dirigidos (Adams e Templeton, 1995; Adams e Templeton, 1998).

Rotineiramente empregam-se vários métodos no controle de doenças infecciosas como o uso de antimicrobianos, pesticidas, vacinação, isolamento e sacrifício. Contudo, a falha nos programas de controle e erradicação de doenças pelos métodos tradicionais, faz com que novas estratégias, como a seleção genética através de cruzamentos dirigidos de animais naturalmente resistentes, tenham valor durante a implementação de programas de erradicação. O cruzamento dirigido pode não prevenir completamente a manifestação da doença, mas pode diminuir a morbidade

reduzindo as perdas econômicas e seu potencial de transmissão. Desta forma, a combinação de programas de vacinação e seleção para resistência genética contra brucelose pode promover melhor proteção do que o programa de vacinação isoladamente (Templeton et al., 1988).

Na tentativa de explorar melhor a resistência genética a doença como um método de controle, tem-se buscado identificar genes específicos que contribuam para resistência natural e conseqüentemente identificar marcadores genéticos ligados a esta característica. Vários genes ligados à resistência natural têm sido identificados, particularmente em camundongos (Templeton et al., 1988, Womack, 1988).

A resistência a *B. abortus* observada em diferentes linhagens de camundongos é geneticamente determinada pelo controle do crescimento do organismo pelo macrófago (Ho e Chers, 1982). O gene *Nramp1* (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*), inicialmente identificado como *Bcg/Ity/Lsh*, controla a resistência natural a infecção por alguns patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis*, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Leishmania donovani* em camundongos, por favorecer a atividade bactericida dos macrófagos contra estes agentes na fase aguda da infecção (Vidal et al., 1993). A resistência à infecção nos animais domésticos, associada ao gene *Nramp1*, tem sido determinada em relação à brucelose

bovina e à salmonelose aviária (Caron et al., 2004).

A resistência natural de bovinos não vacinados é uma característica hereditária associada a um polimorfismo na região não-traduzida da extremidade 3' (3'UTR) do gene *Nramp1* bovino, que pode ser evidenciado pela técnica de SSCA (*single-stranded conformational analysis*) (Feng et al., 1996, Adams e Templeton, 1998). A identificação para futura propagação de genótipos resistentes à infecção por *B. abortus* pode se tornar uma ferramenta valiosa no controle da brucelose em bovinos. Aparentemente, o gene *Nramp1* tem um papel fundamental na resistência genética a brucelose, contudo estas informações são baseadas primariamente em estudos laboratoriais (Barthel et al., 2001) ou estudos de infecção experimental com número reduzido de animais (Adams e Templeton, 1998). Portanto, não há estudos sobre a influência do polimorfismo na região 3'UTR do *Nramp1* bovino sobre a resistência natural à brucelose em condições de campo e nem a determinação da freqüência destes alelos nas principais raças do rebanho nacional.

Desta forma, este trabalho tem objetivo de verificar a influência do polimorfismo do gene *Nramp1* sobre a resistência natural à brucelose experimental e em condições de infecção natural a campo e verificar a freqüência destes polimorfismos nas principais raças zebuínas nacionais e na raça Holandesa.

Capítulo 1

Bibliografia Consultada

Brucelose Bovina

A brucelose bovina é causada pela *Brucella abortus*, com nove biovariedades já identificadas, sendo o biótipo 1 o mais freqüentemente isolado nos casos de brucelose bovina (Nicoletti, 1980). O diagnóstico clínico da brucelose é baseado na manifestação de aborto no terço final de gestação, nascimento de bezerros fracos e infertilidade de machos e de fêmeas (Enright et al., 1984; Ficht, 2003; Poester et al., 2005). Os métodos laboratoriais de diagnóstico são necessários para identificação de animais infectados em um rebanho e, embora o diagnóstico definitivo de brucelose bovina seja feito através do isolamento microbiológico, os métodos sorológicos são mundialmente utilizados para identificar rebanhos infectados (Nielsen, 2002; Poester et al., 2005). O estabelecimento e desenvolvimento da infecção e conseqüentemente a manifestação clínica da doença, dependem da idade e do estado reprodutivo do animal, resistência natural, do estado imunológico, via de infecção, dose infectante e virulência da cepa infectante (Nicoletti, 1980; Adams, 2002).

Em vacas não vacinadas ocorre aborto após o quinto mês de gestação e geralmente nas gestações subseqüentes o bezerro nasce a termo embora a vaca possa ainda apresentar aborto. Uma pequena porcentagem de novilhas infectadas ao nascimento e negativas sorologicamente pode abortar ou ter bezerro infectado na primeira gestação. Estas novilhas são consideradas animais com infecção latente e são importantes na manutenção da doença no rebanho (Wilesmith, 1978). Além do aborto, observa-se queda na produção de leite, aumento na contagem de células somáticas

no leite e redução da fertilidade por aumento no intervalo entre partos em vacas que apresentam aborto ou metrite pós-parto (Gorham et al., 1986; Meador e Deyoe, 1989).

Em touros, *B. abortus* é uma causa importante de orquite (Lambert et al., 1963; Trichard et al., 1982), que pode estar associada à vesiculite seminal e epididimite (Rankin, 1965; McCaughey e Purcell, 1973). Os touros nas primeiras semanas de infecção podem apresentar febre, anorexia e depressão, mas geralmente esses sinais são inaparentes (Campero et al., 1990). Freqüentemente, as orquites são unilaterais (Trichard et al., 1982), mas mesmo nesses casos, o touro pode se tornar estéril devido à degeneração do testículo contralateral (Lambert et al., 1963; Campero et al., 1990) e a infertilidade pode ser temporária ou permanente dependendo da intensidade da lesão.

Em regiões onde a doença é enzoótica, higromas nas articulações e outros sítios são observados em vacas com mais de cinco anos de idade, associados ao histórico de aborto, artrite e longo intervalo entre partos (Musa et al., 1990). *B. abortus* pode ser freqüentemente isolada dos tecidos com sinovite não supurada nos bovinos e artrite imunomediada progressiva e erosiva tem sido observada em bovinos jovens de rebanhos livres vacinados com cepas B19 (Bracewell e Corbel, 1980; Wyn-Jones et al., 1980).

A transmissão da brucelose bovina ocorre principalmente pela ingestão da bactéria, e menos freqüentemente através da penetração pela conjuntiva, pele e mucosas. As principais fontes de infecção são fetos abortados, placentas, anexos fetais e

secreções uterinas contaminadas (Samartino e Enright, 1993; Ko e Splitter, 2003). O leite é fonte importante de infecção para bezerros, além da transmissão transplacentária (Ficht, 2003). Touros geralmente não transmitem a infecção pela monta natural, porém o uso de sêmen contaminado na inseminação artificial pode infectar as vacas inseminadas. O cuidado com avaliação do sêmen é importante, pois mesmo touros sorologicamente negativos podem eliminar a bactéria no plasma seminal (Rankin, 1965).

Após sua entrada no organismo, preferencialmente por via oral, a *B. abortus* é fagocitada por células M, macrófagos e neutrófilos da submucosa intestinal (Ackermann et al., 1988), se aloja em linfonodos regionais onde se multiplica no interior de fagócitos, invade os vasos linfáticos e a bacteremia subsequente permite a disseminação da infecção para vários outros tecidos, especialmente o útero gestante, a glândula mamária e órgãos reprodutivos masculinos (revisado por Ko e Splitter, 2003). No útero gestante de ruminantes, a *B. abortus* tem tropismo pelas células trofoblásticas e a sua multiplicação causa necrose da célula, conseqüentemente placentite necrótica associada a um abundante infiltrado neutrofilico, separação da placenta fetal da materna, morte fetal e aborto (Anderson et al., 1986a). O aborto é resultante da interrupção da circulação fetal causando quadro de hipóxia devido à extensa lesão da placenta ou por endotoxinas da *Brucella*. Os fetos geralmente morrem 24 horas antes de sua expulsão. (Enright et al., 1984; Lopez et al., 1984). Nos fetos abortados, nem sempre são observadas lesões nos tecidos em que se isola *Brucella abortus* (Meador et al., 1988). A infecção persiste em aproximadamente 80% das vacas infectadas e fica confinada a glândula mamária e linfonodos supramamários por toda vida do animal (Manthei e Carter, 1950; Nicoletti, 1980; Corner et al., 1987).

A *B. abortus* multiplica-se no interior das células do epitélio trofoblástico bovino, preferencialmente no final da gestação. Células trofoblásticas do início da gestação praticamente não permitem o crescimento intracelular da bactéria. Estes dados correlacionam bem com a manifestação clínica de aborto no terço final da gestação (Samartino et al., 1994; Samartino e Enright, 1996). A afinidade de *B. abortus* pelo trofoblasto de ruminantes nesta fase gestacional parece estar relacionada à presença de elevadas concentrações de eritritol e hormônios esteróides na placenta (Samartino e Enright, 1993; Enright e Samartino, 1994). A *B. abortus* é um dos poucos organismos que tem a capacidade de utilizar o eritritol como fonte de carbono e energia (Samartino e Enright, 1993). A entrada da *B. abortus* na placenta de ruminantes ocorre através das células eritrofagocitárias do trofoblasto, localizadas na base das vilosidades coriônicas nos cotilédones (Murai e Yamauchi, 1986; Santos et al., 1996), com posterior extensão para o trofoblastos intercotiledonários (Anderson et al., 1986a). Após a penetração, as bactérias iniciam o processo de replicação no interior de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Anderson et al., 1986b; Meador e Deyoe, 1989). Posteriormente, as células sofrem necrose levando a ulceração da membrana cório-alantóidea e liberação de grande número de bactérias que, então, infectam os tecidos fetais (Anderson et al., 1986a/b).

Nas vacas infectadas, os linfonodos estão aumentados de volume, hiperplásicos e hemorrágicos, principalmente aqueles localizados próximo ao ponto de entrada do agente (Jubb et al., 1993). As lesões macroscópicas da placenta são características, mas não patognomônicas. As lesões na placenta não são uniformes sendo que alguns placentomos estão aparentemente normais enquanto outros estão necróticos ou hemorrágicos. Os placentomos afetados têm aspecto friável, coloração amarelo-

acinzentada e recobertos por exsudato amarronzado de odor fétido. Há considerável variação na severidade das lesões placentárias. Se a lesão é severa, ocorre aborto ou nascimento de prematuros e se é menos severa, o bezerro pode nascer a termo (Jubb et al., 1993). Lesões macroscópicas não são detectáveis na glândula mamária, mas os linfonodos supramamários freqüentemente estão aumentados de volume (Meador et al., 1989).

Os fetos abortados geralmente estão autolisados, edematosos, contendo líquido tingido de sangue no tecido subcutâneo e nas cavidades corporais. Em alguns casos os órgãos abdominais estão recobertos por fibrina. O conteúdo estomacal pode estar turvo, amarelado ou amarronzado com flocos de fibrina (Hong et al., 1991; Enright et al., 1984). A pleuropneumonia é a lesão fetal mais comum em casos de aborto por brucelose, mas nem todos os fetos abortados têm esta lesão (López et al., 1984). Os pulmões podem estar aparentemente normais ou quando alterados, estão aumentados de volume, com áreas focais a difusas de coloração acizentadas e firmes a palpação, septos interlobulares espessos e edematosos e a pleura hemorrágica e recoberta por fibrina. Os linfonodos, mais freqüentemente os ilíacos internos, bronquiais e pré-hepático, estão aumentados, edematosos com espessamento da região cortical e hiperplasia dos nódulos linfóides (Enright et al., 1984; Gorham et al., 1986). As adrenais também podem estar aumentadas de volume. O timo pode estar diminuído de tamanho, menos firme que o normal e os septos conjuntivos edematosos e com hemorragias petequiais (Enright et al., 1984).

Histologicamente, as vacas apresentam hiperplasia dos folículos linfóides, linfadenite multifocal caracterizada por focos de neutrófilos e áreas de hemorragia e posteriormente processo granulomatoso multifocal. Essas alterações são mais

freqüentes nos linfonodos mandibulares, parotídeos, supramamários e ilíacos internos. No baço observa-se hiperplasia linfóide e infiltrado multifocal de polimorfonucleares (Payne, 1959; Meador et al., 1988, Meador et al, 1989). No útero, logo após o aborto, há endometrite difusa caracterizada por infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos no interstício e também no lume das glândulas endometriais distendidas. O epitélio endometrial pode estar ulcerado e recoberto por fibrina e restos celulares. A superfície caruncular está necrótica com intenso infiltrado neutrofílico na lâmina própria. Exsudato contendo neutrófilos, eritrócitos e bactérias intra e extracelulares está presente no lume uterino e nas vilosidades carunculares. Na placenta, as células trofoblásticas estão distendidas com inúmeros cocobacilos Gram negativo associados a edema, necrose, acúmulo de fibrina, infiltrado inflamatório de macrófagos e neutrófilos, sendo que em alguns casos observa-se também vasculite (Payne, 1959; Meador et al, 1988; Meador et al, 1989 Meador e Deyoe, 1989). Quatro a seis semanas após o aborto, observa-se infiltrado mononuclear com poucos neutrófilos, multifocal a difuso, moderado, periglandular e perivascular (Meador et al., 1988). A glândula mamária geralmente apresenta mastite intersticial multifocal ou difusa discreta, com infiltração principalmente de macrófagos e com alguns lumes glandulares repletos de neutrófilos. Posteriormente, há somente um acúmulo discreto de linfócitos e poucos macrófagos no parênquima (Payne, 1959; Meador et al., 1988; Meador et al., 1989).

Pneumonia fetal e placentite necrótica são as lesões mais freqüentemente observadas na brucelose (Hong et al., 1991). Nos pulmões observa-se broncopneumonia ou pneumonia intersticial com quantidade variável de fibrina e predomínio de infiltrado inflamatório histiocitário e infiltração focal ou multifocal de neutrófilos. Os septos

apresentam-se edematosos e, às vezes, observa-se arterite necrótica nos vasos pulmonares (Enright et al., 1984; Meador et al., 1988; Jubb et al., 1993). Os linfonodos apresentam hiperplasia dos folículos linfóides e acúmulo de plasmócitos, macrófagos e focos de neutrófilos e eosinófilos nos seios medulares, podendo, em alguns casos, apresentar áreas focais com acúmulo de células gigantes e macrófagos epitelióides. No baço observa-se hiperplasia linfóide e no timo depleção linfóide acompanhado de edema e hemorragia focal (Enright et al., 1984). Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal, focos de necrose e granulomas com células gigantes estão presentes no fígado, baço e rim (Hong et al., 1991, Enright et al., 1984; Meador et al., 1988). Meningite histiocitária multifocal ou difusa associada ou não à presença da bactéria e vasculite, já foi descrita em alguns fetos abortados. O quadro de meningite pode estar associado com inflamação sistêmica, pericardites, peritonites e artrites fibrinopurulentas (Hong et al., 1991).

Patogênese da *Brucella abortus*

B. abortus é uma bactéria Gram negativo, intracelular facultativa e sua patogenicidade está associada com os mecanismos que permitem sua invasão, sobrevivência e multiplicação intracelular nas células do hospedeiro (revisado por Gorvel e Moreno, 2002). Durante a infecção, a bactéria tem a capacidade de sobreviver à ação bactericida dos neutrófilos e de se multiplicar dentro de macrófagos e de fagócitos não profissionais como o trofoblasto. A bactéria internalizada por fagócitos, pode tanto ser destruída no interior de fagolisossomos como sobreviver nestes compartimentos ou multiplicar em sítios intracelulares de replicação. Quando *B. abortus* está opsonizada, ela se torna mais susceptível a ação bactericida dos macrófagos (Gorvel e Moreno, 2002). Em fagócitos não profissionais, a bactéria uma vez dentro da célula inibe a função do

lisossomo com fagossomo e replica no retículo endoplasmático rugoso (Detilleux et al., 1990a/b; Pizarro-Cerdá, et al., 1998).

A infecção por *B. abortus* inibe a fusão entre o fagossomo e o lisossomo, tanto em células fagocíticas quanto em células não-fagocíticas. Um sistema de secreção tipo IV, semelhante ao encontrado em patógenos de plantas como o *Agrobacterium tumefaciens*, está envolvido com a regulação do trânsito das formas virulentas de *B. abortus* entre os autofagossomos e as cisternas do retículo endoplasmático rugoso, sendo considerado como importante fator de virulência (revisado por Boschioli et al., 2002 e Ko e Splitter, 2003). As formas lisas de *B. abortus* são mais eficientes no processo de invasão e resistentes à degradação por fagócitos que as formas rugosas, indicando que o lipopolissacarídeo (LPS) da *Brucella*, apesar de sua baixa atividade biológica, é um fator de virulência com papel importante na sobrevivência das bactérias no interior das células do hospedeiro (revisado por Gorvel e Moreno, 2002 e Ko e Splitter, 2003). Desta forma, a *B. abortus* é capaz de se multiplicar intensamente dentro da célula sem prejudicar as funções celulares básicas ou sem causar danos às células. Esta sobrevivência intracelular é responsável pelo estabelecimento da infecção crônica (Ko e Splitter, 2003).

A resposta do bovino à brucelose envolve a imunidade inata e a adquirida. A resposta imune efetiva à infecção por *B. abortus* nos bovinos é a imunidade celular caracterizada pela ativação antígeno-específica dos linfócitos T auxiliar ou CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos ou CD8⁺. A bactéria é fagocitada pelos macrófagos que secretam interleucina 12 (IL-12), citocina responsável pela diferenciação dos linfócitos T auxiliar subtipo 1 (Th1) que produzem INF γ (Interferon- γ), que por sua vez ativam a função bactericida dos macrófagos (Splitter et al., 1996; Oliveira et al., 2002). Os linfócitos T citotóxicos são importantes por

destruírem os macrófagos infectados através de mecanismos citotóxicos e por secretarem $\text{INF}\gamma$ (Oliveira et al., 2002, Wyckoff III, 2002). A ativação dos linfócitos B e a produção de anticorpos específicos têm como principal função protetora a opsonização, mecanismo que facilita a fagocitose (Ko e Splitter, 2003). Embora as células T CD4^+ desempenhem papel importante na imunidade contra *B. abortus*, essas células não são essenciais na proteção contra a infecção. A resposta imune protetora depende da ativação de linfócitos T CD8^+ (Oliveira et al., 1998). Além da IL-12 e do $\text{INF}\gamma$, outras citocinas podem ter papel importante na resposta a brucelose como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a Interleucina 1 (IL-1) que ajudam no controle da taxa de replicação intracelular da *Brucella* (Ko e Splitter, 2003) e interleucina-10 (IL-10) que limita a resposta inflamatória e esta associada com a persistência da infecção em camundongos (Golding et al., 2001).

A imunidade inata é responsável pela diminuição do número inicial de bactérias e pelo melhor desenvolvimento da imunidade adquirida (revisado por Golding et al., 2001 e Ko e Splitter, 2003). As células *natural killer* (NK) aparentemente têm importância nos estágios iniciais da infecção promovendo destruição direta de células infectadas e secreção de $\text{INF}\gamma$ (Golding et al., 2001). Um aspecto importante da imunidade inata à brucelose é que, em bovinos, a resistência natural à *B. abortus* é hereditária e a frequência de genótipos resistentes pode ser bastante aumentada pela seleção genética feita por meio de acasalamentos dirigidos (Adams e Templeton, 1995). A resistência genética à brucelose é consistente com a existência de dois ou mais genes controlando os fenótipos resistentes. E aparentemente, um gene conhecido como *Nramp1* (*Natural resistance associated macrophage protein 1*) tem papel fundamental na resistência

genética a brucelose (Feng et al., 1996; Adams e Templeton, 1998).

Resistência Natural e o gene *Nramp1*

Resistência natural à doença se refere à capacidade do animal a resistir a doença quando exposto ao agente infeccioso sem ter tido uma exposição prévia ou imunização (Templeton et al., 1988). Muitos genes que controlam o processo de resistência natural estão sendo identificados em estudos realizados principalmente em camundongos e muitos desses genes funcionais nesta espécie, podem ser também funcionais no homem e nos animais domésticos (Adams e Templeton, 1998).

Diversos estudos em camundongos identificaram genes no cromossomo 1 que controlam a resistência natural a patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* - bacilo de Bilié-Calmette-Guérin (Gros et al., 1981), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (Lissner et al., 1983) e *Leishmania donovani* (Bradley et al., 1979), que foram nomeados como locus *Bcg*, *Ity* e *Lsh*, respectivamente. Posteriormente, foi demonstrado que tais locus correspondiam na realidade a um único gene, o *Nramp1*, que controla a resistência natural à infecção por patógenos intracelulares em camundongos, por favorecer a atividade bactericida dos macrófagos contra estes agentes na fase aguda da infecção (Vidal et al., 1993, Vidal et al., 1995). A diferença entre o alelo do gene *Nramp1* que confere susceptibilidade a patógenos intracelulares em camundongos do alelo resistente é uma mutação recessiva pontual caracterizada pela substituição da glicina por ácido aspártico na posição 169 localizada no quarto domínio transmembrânico da proteína, tornando-a sensível a degradação e não integração com a membrana (Malo et al., 1994; Vidal et al., 1996). Embora o alelo resistente *Nramp*^{G169} em camundongo esteja associado com controle de patógenos intracelulares como

espécies de *Mycobacterium*, *L. donovani*, *S. Typhimurium*, ele não controla a infecção por *M. tuberculosis* (revisado por North e Medina, 1998) e *Brucella melitensis* (Guilloteau et al., 2003).

O *Nramp1*, atualmente renomeado como *Slc11a1* (*Solute carrier family 11 member 1*), é um gene presente no cromossomo 1 dos camundongos que codifica uma proteína de 90-100 Kda, expressa em macrófagos, com 12 domínios transmembrânicos, alças extra citoplasmáticas glicosiladas e vários sítios de fosforilação (Vidal et al., 1993, Barton et al., 1994). No macrófago, a proteína *Nramp1* é expressa na membrana de lisossomos e endossomos tardios e, após a fagocitose, é recrutado para a membrana do fagolisossomo (Gruenheid et al., 1997). A sua expressão é maior em macrófagos de camundongos resistentes (*Nramp^{G169}*) comparada com macrófagos de camundongos susceptíveis (*Nramp^{D169}*) e é induzida por INF γ , LPS, TNF- α e IL-1 (Searle et al., 1998; Wyllie et al 2002).

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

A proteína *Nramp1* é um transportador de cátions divalentes como ferro (Fe²⁺) e manganês (Mn²⁺), dependente do pH. A *Nramp1* transporta os cátions do lume do fagolisossomo para o citoplasma e desta forma previne a aquisição de ferro pelos patógenos intracelulares como a *Brucella* sp.

(Gomes e Appelberg, 1998; Atkinson e Barton, 1999; Jabado et al., 2000; Forbes e Gros, 2003). Por outro lado, outros experimentos sugerem que o movimento dos cátions ocorre na direção oposta resultando no aumento da concentração de ferro dentro do fagolisossomo, que pode favorecer a eliminação do patógeno por geração de intermediários de oxigênio através da reação de Fenton (Kuhn et al., 1999; Zwilling et al., 1999; Goswami et al., 2001). Além disso, *Nramp1* está envolvida em efeitos pleiotrópicos (revisado por Blackwell e Searle, 1999), favorecendo a estabilização do RNA mensageiro de citocinas e modulando o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (Wyllie et al., 2002). Em resumo, *Nramp1* tem papel crítico na imunidade inata favorecendo a eliminação do patógeno por macrófagos e ainda influencia a imunidade adaptativa.

O *Nramp1* pertence a uma família de proteínas extremamente conservada na evolução, com homologia entre mamíferos, insetos e bactérias sugerindo um importante papel em todos os organismos vivos (revisado por Skamene et al., 1998). E, tanto em mamíferos quanto em bactérias, o *Nramp1* (ou seus heterólogos) tem a mesma função, ou seja, é um transportador de cátions divalentes. Os cátions divalentes são importantes para sobrevivência das bactérias, pois participam da replicação do DNA, de enzimas bacterianas que neutralizam a ação antimicrobiana do fagolisossomo e também pode regular a expressão de diferentes fatores de virulência nos patógenos. Estes dados sugerem que bactérias e células do hospedeiro podem competir pelos nutrientes, ambos utilizando os mesmos mecanismos e a interação resultante entre parasito e hospedeiro é determinante para o estabelecimento da infecção (revisado por Gruenheid e Gros, 2000, Forbes e Gros, 2001).

Um segundo membro da família, o gene *Nramp2*, codifica uma proteína com 78% de

homologia com o Nramp1, mas a Nramp2 é expressa em todos os tipos celulares (Skamene et al., 1998) e tem sua expressão regulada pelo ferro. O Nramp2 é o principal sistema de transporte de ferro independente de transferrina nas células intestinais e também atua como um sistema de aquisição intracelular de ferro, transportando o ferro e outros cátions divalentes dos endossomos acidificados para o citoplasma de célula (Gruenheid e Gros, 2000). Uma mutação pontual no gene *Nramp2* (Gly185Arg) em camundongos e ratos causa anemia microcítica intensa associada à incapacidade de captar ferro no intestino e tecidos periféricos (Forbes e Gros 2001).

Baseado nos achados em camundongos, um gene homólogo ao *Nramp1* murino foi identificado no homem (Cellier et al., 1994). O gene *Nramp1* do camundongo tem uma similaridade grande com a seqüência de nucleotídeos do *Nramp1* humano. No homem, o *Nramp1* é expresso em macrófagos, mas também em neutrófilos do sangue, pulmão e baço e não ocorre o mesmo tipo de mutação pontual decisiva para o fenótipo de susceptibilidade como observado no camundongo. Vários polimorfismos estão sendo identificados no *Nramp1* humano tanto na seqüência reguladora da região promotora quanto na região não traduzida da extremidade 3' (Skamene et al., 1998). Estes polimorfismos estão associados à resistência e susceptibilidade a doenças infecciosas e doenças autoimunes (revisado por Blackwell et al., 2003), tendo sido melhor estudados em associação com resistência contra tuberculose (Belamy et al., 1998 Greenwood et al.; 2000, Zang et al., 2005), bem como na susceptibilidade à artrite reumatóide (Shaw et al., 1996; Yen et al., 2005), doença de Crohn (Hofmeister et al, 1997), sarcóide (Dubaniewicz et al., 2005) e diabetes (Takahashi et al, 2004). Os polimorfismos do *Nramp1* aparentemente não estão associados à resistência contra a brucelose no homem (Bravo et al., 2005).

Nos animais domésticos, homólogos do *Nramp1* foram identificados e sequenciados em bovinos (Feng et al., 1996), aves (Hu et al., 1996), suínos (Tuggle et al., 1997), ovinos (Bussmann et al 1998), cães (Altet et al., 2002) e eqüinos (Matiasovic et al., 2002), mas associação com resistência natural contra patógenos intracelulares foi documentada somente na brucelose bovina e na salmonelose aviária (Hu et al., 1997; Adams e Templeton, 1998; Caron et al., 2004).

Resistência Natural à brucelose bovina e gene *Nramp1*

A resistência natural contra a infecção por *Brucella* sp. é geneticamente determinada em várias espécies como camundongo, coelhos e suínos (Adams e Templeton, 1995). Em suínos, o cruzamento de suínos considerados resistentes por não desenvolverem anticorpos após infecção por *Brucella suis*, resulta em uma progênie 76% resistente a brucelose (Cameron et al., 1942). Contudo, o mecanismo envolvido na resistência natural bem como os genes envolvidos no controle da resistência ainda não foram identificados. Em diferentes linhagens de camundongos foi demonstrado que a resistência natural à infecção por *B. abortus* é geneticamente determinada por mais de um gene (Ho e Cheers, 1982). Porém esta diferença não está associada à capacidade dos macrófagos em controlar da replicação intracelular da bactéria (Sathiyaseelan et al.; 2000) e outros fatores tem sido associados a este fenótipo (revisado por Baldwin e Parent 2002).

A resistência natural à infecção por *B. abortus* em bovinos foi primeiramente observada em um estudo de seleção e cruzamento de vacas e touros resistentes e susceptíveis. Os animais foram considerados resistentes na ausência da manifestação clínica de aborto e ausência de isolamento de *B. abortus* (Adams e Templeton, 1995;

Adams e Templeton, 1998). Estudos feitos nos Estados Unidos indicaram que a frequência de fenótipos naturalmente resistentes na população bovina em geral é de 20%, sendo que o acasalamento de touros e vacas resistentes resultou em aumento desta frequência para 58,6%. Análises genéticas dos resultados destes acasalamentos foram consistentes com a existência de dois ou mais genes controlando os fenótipos resistentes (Adams e Templeton, 1995). Em resumo, a resistência natural à *B. abortus* em bovinos é hereditária e a frequência de genótipos resistentes pode ser bastante aumentada pela seleção genética feita por meio de acasalamentos dirigidos.

Os macrófagos de bovinos fenotipicamente resistentes possuem a capacidade de controlar a replicação intracelular *in vitro* da *B. abortus* (Harmon et al., 1989; Price et al., 1990; Campbell e Adams 1992; Qureshi et al., 1996) e também de *Salmonella enterica* sorotipo Dublin e de *Mycobacterium bovis*, mas não de *S. Typhimurium* (Qureshi et al., 1996). Esta resistência dos macrófagos *in vitro* tem correlação de 83% com a resistência *in vivo* (Adams et al., 1996). Além disso, macrófagos de vacas resistentes ao fagocitar bactéria opsonizada apresentam uma maior produção de intermediários reativos do oxigênio, mecanismo pelo qual o macrófago mata bactérias intracelulares (Harmon et al., 1989), e expressão diferenciada de RNAm de diversos genes potencialmente envolvidos no controle do crescimento bacteriano intracelular, incluído genes de citocinas e *Nramp1* (Adams e Templeton, 1995). Além disso, bovinos fenotipicamente resistentes apresentam produção de IgG_{2a} baixa e de curta duração em resposta ao LPS da *B. abortus*, além de uma produção diferenciada dos alótipos A1 e A2 quando comparada com bovinos susceptíveis. Contudo, não está claramente demonstrada a importância de anticorpos na resistência natural à brucelose (Adams e Templeton, 1998). Desta forma, a diferença

na função macrofágica aparentemente é o fator responsável pela resistência natural à brucelose em bovinos.

O gene bovino homólogo ao *Nramp1* murino, chamado de *Nramp1* bovino, foi clonado e seu cDNA foi seqüenciado. O *Nramp1* bovino codifica uma proteína de 60 KDa expressa predominantemente em macrófagos e células reticuloendoteliais. A proteína apresenta uma homologia de 86,9% com o *Nramp1* do camundongo e 88,6% com *Nramp1* humano (Feng et al., 1996). Um estudo experimental, com 22 vacas não vacinadas divididas em resistentes e susceptíveis à brucelose, demonstrou associação altamente significativa entre polimorfismos da região não traduzida da extremidade 3' (3'UTR) do *Nramp1* bovino com resistência natural à brucelose, tendo sido os polimorfismos identificados pela técnica de SSCA (*single strand conformational analysis*) (Adams e Templeton, 1998). Estes polimorfismos estão associados à variação no número de repetições do dinucleotídeo GT no microsatélite (GT)_n na porção 3' terminal, além da ocorrência de substituição do nucleotídeo T por G na extremidade 5' (Adams e Templeton, 1998; Horin et al., 1999). O polimorfismo de um gene indica que existe mais de um alelo deste gene na população e alelos com diferentes números de pares GT estão relacionados à resistência ou à susceptibilidade dos bovinos aos patógenos intracelulares, particularmente *B. abortus* (Horin et al., 1999).

O *Nramp1* bovino controla a replicação de *B. abortus*, mas não de *S. Dublin*, em linhagens de macrófagos RAW264.7 de camundongos susceptíveis. O polimorfismo da 3'UTR do *Nramp1* está associado com nível de expressão na célula e com a susceptibilidade à *B. abortus* (Barthel et al., 2001). O polimorfismo nesta região não codificadora da proteína pode ter influência sobre a transcrição ou sobre a estabilidade da molécula de RNAm que codifica a

proteína Nrampl, sendo que o alelo resistente GT13 está associado a maior expressão, quando comparado com o alelo susceptível GT16 (Barthel et al., 2001; Caron et al., 2004).

A resistência natural contra a tuberculose bovina também possui um carácter genético sendo que raças zebuínas parecem ser mais resistentes que raças taurinas (revisado por Adams e Templeton, 1998). Apesar do *Nrampl* ser o principal gene candidato para o controle da resistência natural a patógenos intracelulares, não há associação com resistência contra *M. bovis* (Barthel et al, 2000). E a expressão elevada de Nrampl em monócitos do sangue e macrófagos presentes em granulomas foi observada em animais

infectados por *M. bovis*, indicando que a expressão mais elevada do Nrampl não controla a infecção por *M. bovis* (Estrada-Chávez et al., 2001).

Outras diferenças na seqüência do *Nrampl* bovino foram identificadas entre raças bovinas e bubalinas (Ables et al., 2002) e, recentemente, o gene foi seqüenciado quase por completo e um novo polimorfismo, localizado em uma região codificadora da proteína, foi identificado através do SSCA (Coussens et al., 2004). Contudo, a importância desses novos polimorfismos na influência do *Nrampl* na resistência natural contra a brucelose e outros patógenos intracelulares não é conhecida.

Capítulo 2

Frequência dos alelos da 3'UTR do gene *Nramp1* em diferentes raças bovinas*

Introdução

O estudo da resistência natural contra doenças em diferentes raças bovinas tem crescido ao longo dos anos. O seu objetivo é identificar raças mais resistentes a doenças endêmicas em determinadas regiões do mundo de forma a contribuir para o controle e erradicação de dessas doenças através da seleção genética.

Diversos estudos indicam que as raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) são mais resistentes a babesiose (Parker et al., 1985; Bock et al., 1999), a carrapatos (Rechav e Kostrzewski, 1991; Wambura et al, 1998) e a nematodos (Peña et al, 2000), quando comparadas às raças taurinas (*Bos taurus taurus*). Na África, existe um *Bos taurus*, o Gambian N'Dama, comprovadamente mais resistente à tripanossomíase que as demais raças bovinas (Naessens et al., 2002). Esta resistência natural se deve a resposta imunológica mais eficiente do hospedeiro contra um patógeno específico e pode estar associada a um ou mais genes (Spooner et al., 1975; Barger, 1989).

Embora vários fatores do hospedeiro estejam associados com a imunidade inata contra *Brucella abortus* (revisado por Baldwin e Parent, 2002), resistência natural a brucelose em bovinos está associada ao polimorfismo da 3'UTR (região não-traduzida da extremidade 3') do gene *Nramp1* (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*) bovino. Estes polimorfismos podem ser facilmente detectados pela técnica de SSCA (*Single Strand Conformational Analysis*)

(Feng et al., 1996; Adams e Templeton, 1998) e estão associados à variação no número de dinucleotídeos GT (GT)_n, além da ocorrência de substituição de um nucleotídeo T por G (Horín et al., 1999). Estudo experimental indica que um determinado alelo está associado com uma menor replicação intracelular da *B. abortus* em macrófagos (Barthel et al., 2001).

Ables et al. (2002) detectaram diferenças na sequência do gene *Nramp1* em diferentes raças bovinas e bubalinas, mas nenhuma destas diferenças foi ainda associada à resistência natural à brucelose bovina. O objetivo deste estudo foi comparar a frequência dos alelos do gene *Nramp1*, associados com resistência e susceptibilidade à infecção por *B. abortus* entre raças bovinas zebuínas e taurinas.

Material e métodos

Foram estudados ao todo 248 bovinos registrados, de ambos os sexos, com genealogia conhecida e pai e mãe distintos. Dentre os bovinos estudados, 81 eram *Bos taurus taurus* representados pela raça Holandesa e 167 animais *Bos taurus indicus* representados pelas raças: Nelore (n=95), Guzerá (n=37) e Gir (n=35).

As amostras de sangue total, coletadas em anticoagulante EDTA dissódico, foram obtidas de laboratórios de genética ou diretamente de propriedades particulares. As amostras originaram dos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de

* Artigo publicado: 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.109, p.37-42, 2006.

Janeiro, Santa Catarina, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Tocantins. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo de tiocinato de guanidina como previamente descrito (Pitcher et al., 1989). A papa de leucócitos foi misturada a 100µl de tampão TE pH 8,0 e as células lisadas com 500µl de reagente de GES por 10 minutos. As proteínas foram então precipitadas com acetato de amônio a 7M por 10 minutos em gelo e o DNA separado no sobrenadante com 500µl de clorofórmio 2-pentanol por 10 minutos a 14.000rpm. O DNA foi precipitado do sobrenadante com 405µl de Isopropanol por 5 minutos a 14.000rpm, o pellet foi lavado com etanol a 70% e diluído em 50µl de água.

A genotipagem foi realizada pela técnica de SSCA que tem sido extensivamente utilizada para identificação de inserções e exclusões. SSCA é uma técnica baseada na eletroforese de DNA desnaturado ou em fita simples, com o intuito de identificar pequenas diferenças no tamanho dos fragmentos de DNA amplificado (Orita et al., 1989). Iniciadores específicos para a amplificação da 3'UTR do gene *Nramp1* bovino (5'-AAGGCAGCAAGACAGACAGG-3' e 5'-ATGGAACCTCACGTTGGCTG-3') foram utilizados para a SSCA como previamente descrito (Barthel et al., 2000). A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi feita com 50ng do DNA genômico em 15µL de mistura contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 200µM de dNTPs, 5µM de primers e 0,3 unidades de Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil).

Os parâmetros da PCR foram: um passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), anelamento (40 segundos a 60°C), extensão (1 minuto a 72°C) e um passo final de extensão de 7 minutos a 72°C. O produto da PCR será mantido a temperatura de 4°C. Os produtos

amplificados pela PCR foram desnaturados por 3 minutos a 94°C e resolvidos por eletroforese em gel de acrilamida a 6% a 250 volts por 90 minutos. Após eletroforese, o gel de acrilamida foi fixado em solução com 10% álcool etílico e 0,5% de ácido acético, corado com solução de nitrato de prata a 5% e revelado com solução de hidróxido de sódio a 3% com 0,5% de formol. Amostra de DNA de bovino fenotipicamente e genotipicamente resistente previamente genotipada em um laboratório de referência (Dr Garry Adams, Texas A&M University, College Station, TX, USA) foi processada e utilizada como controle para a especificidade da reação.

A frequência dos diferentes alelos da 3'UTR do gene *Nramp1* bovino foi comparada entre as quatro raças através do teste exato de Fisher utilizando o programa GraphPad InSart software versão 3.05 (GraphPad InSart software, Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados e discussão

Os alelos do gene *Nramp1* bovino apresenta uma variação no número de repetições GT na região 3'UTR e esta variação tem sido associada a resistência ou susceptibilidade à *B. abortus*. Quatro produtos de PCR diferentes foram amplificados e identificados pela SSCA: uma banda com 175pb, uma banda com 177pb e bandas duplas contendo 175pb e 177pb ou 175pb e 179pb. De acordo com estudos previamente publicados (Adams e Templeton, 1998; Barthel et al., 2000; Barthel et al., 2001), DNA de bovinos considerados genotipicamente resistentes à brucelose originam um produto que é visualizado no gel de poli-acrilamida como uma banda com 175pb (homozigoto GT13) correspondendo a 3'UTR com 13 pares de GT (alelo GT13). Já o DNA de animal considerado genotipicamente susceptível é revelado como uma banda com 177pb (homozigoto GT14) ou como bandas duplas contendo

175pb e 177pb ou 175pb e 179 pb (heterozigotos GT13/GT14 ou GT13/GT15, respectivamente) como demonstrado na figura 1. Estudos prévios demonstram que o alelo GT13 está associado com resistência natural enquanto os outros alelos

identificados estão associados com susceptibilidade a brucelose. Portanto, o único genótipo que tem sido associado à resistência é o homozigoto GT13 (Barthel et al., 2000; Barthel et al., 2001).

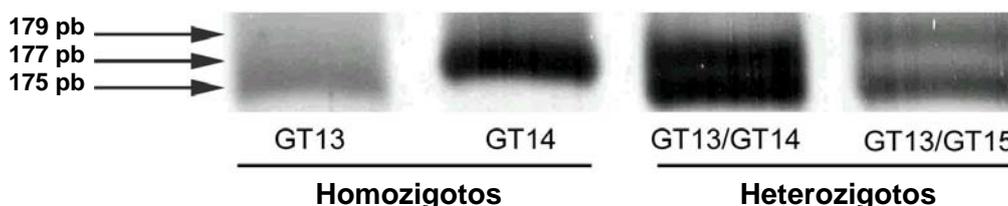


Figura 1. Resultado representativo do SSCA para identificação dos alelos do gene *Nramp1*. As setas indicam produtos do tamanho 175, 177 e 179 pares de base correspondendo a GT13, GT14 e GT15, respectivamente.

Ao avaliar todos os animais, 53,6% (133/248) apresentaram o genótipo homozigoto GT13. Houve diferença significativa da frequência dos genótipos entre as raças zebuínas (*B. taurus indicus*) e a raça Holandesa (*B. taurus taurus*). A raça Holandesa apresentou uma homogeneidade do genótipo com 100% dos animais estudados apresentando genótipo homozigoto GT13, diferindo das raças zebuínas (Fig. 2). Já a raça Nelore foi a que apresentou maior heterogeneidade, com quatro combinações diferentes dos alelos, representadas por homozigoto GT13, homozigoto GT14, heterozigotos GT13/14 e

GT13/15. O genótipo mais freqüente observado nas raças Nelore e Gir foi o heterozigoto GT13/14 enquanto o genótipo homozigoto GT14 predominou na raça Guzerá (Fig. 3). Ao comparar as raças zebuínas entre si, só foi observada diferença na frequência dos genótipos GT13 e GT14 entre as raças Nelore e Guzerá (Fig. 3). É digno de nota que apesar de outras combinações como GT14/GT15 tão bem como uma possível combinação homozigota GT15 não terem sido identificada neste estudo, não é possível afirmar que estas combinações não ocorram nas raças estudadas.

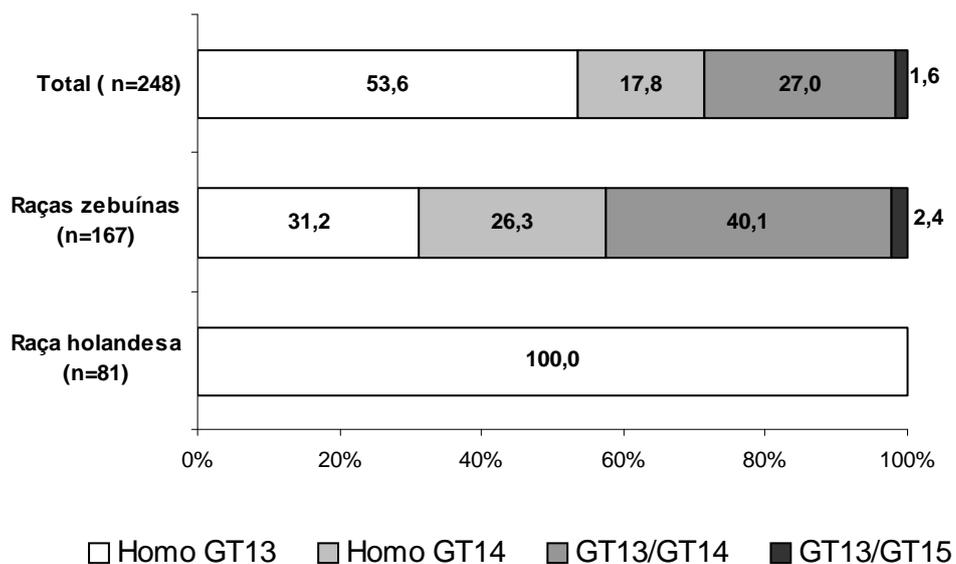


Figura 2. Distribuição da freqüência dos genótipos do gene *Nrampl* em animais da raça Holandesa e de raças zebuínas. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as raças (P=0,001). Legenda: Homo GT13 = homocigoto GT13, Homo GT14 = homocigoto GT14, GT13/GT14 = heterocigoto GT13/GT14, GT13/GT15 = heterocigoto GT13/GT15.

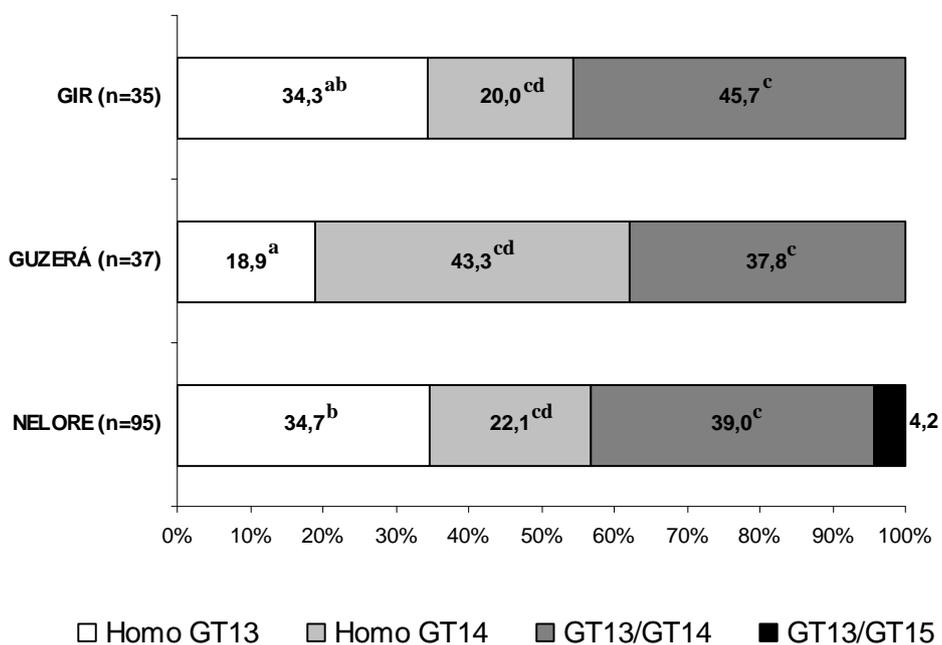


Figura 3. Distribuição da freqüência dos genótipos do gene *Nrampl* nas raças Gir, Guzerá, Nelore. Letras diferentes em um mesmo genótipo diferem estatisticamente entre si (P<0,05). Legenda: Homo GT13 = homocigoto GT13, Homo GT14 = homocigoto GT14, GT13/GT14 = heterocigoto GT13/GT14, GT13/GT15 = heterocigoto GT13/GT15.

Uma razão provável para a alta frequência do alelo resistente na raça Holandesa deve-se ao fato de que esta raça vem sendo submetida a cruzamento seletivo por longo período, tendo sido selecionada por centenas de anos para características de produção. O gado Holandês sofreu pressão de seleção para características raciais na sua região de origem e mais recentemente, desde o século XVII, esta raça tem sido selecionada para produção leiteira particularmente nos Estados Unidos (Becker, 1973, Santiago, 1987). O rebanho Holandês do Brasil tem origem principalmente de animais oriundos dos Estados Unidos e do Canadá (Costa et al., 2000). Esta pressão de seleção pode ter selecionado indiretamente para o alelo GT13. Por outro lado, a evolução da raça Nelore no Brasil é bem mais recente. Além disso, esta raça originou-se de uma raça zebu indiana chamada Ongole misturada a outras raças indianas. Na Índia, historicamente quase todos os cruzamentos não são direcionados para seleção (Santiago, 1972, Santiago, 1987). O período mais curto de seleção e a heterogeneidade da raça que originou o gado Zebu brasileiro podem explicar a grande variação observada nos animais zebuínos quando comparados com animais da raça Holandesa.

Contudo, apesar do gado holandês apresentar uma frequência muito maior do genótipo resistente não se pode afirmar que esta raça é mais resistente que as raças zebuínas estudadas. Isto porque a associação do genótipo com a resistência natural à brucelose é baseada em estudos *in vivo* (Adams e Templeton, 1998) e *in vitro* (Barthel et al., 2001) e não em estudos a campo. Alguns trabalhos descrevem a prevalência da brucelose bovina em diversas regiões do mundo e seus principais fatores de risco. Muitos pesquisadores encontraram maior prevalência da brucelose em gado de leite (Christie, 1969; Moreno, 2002), enquanto outros indicam maior prevalência

em gado de corte (Jiwa et al., 1996; Samartino, 2002) e, ainda, outros pesquisadores não observaram nenhuma predisposição pelo tipo de criação (Luna-Martinez e Meija Terán, 2002). No Brasil, onde a prevalência da brucelose bovina é em torno de 5%, nunca foi reconhecida nenhuma predisposição racial para a doença (revisado por Poester et al., 2002).

Aparentemente, a diferença na prevalência da doença é mais influenciada pelo tipo de criação do que propriamente pela raça. Isto porque, animais criados em sistemas intensivos tende a ter maior risco (Kellar et al., 1976; Salmam e Meyer, 1984; Omer et al., 2000). Para comparar a prevalência da brucelose entre raças zebuínas e européias, o estudo deve ser realizado sob as mesmas condições de criação, o que é inviável. Por esta razão, não há estudos comparando a prevalência de brucelose entre diferentes raças bovinas. Estes resultados também podem sustentar a hipótese de que raças zebuínas podem ter fatores de resistência adicionais que resultaram na baixa pressão de seleção para o alelo GT13, mas podem existir outras explicações, como revisado por Baldwin e Parent (2002).

Conclusão

Existe diferença significativa na frequência dos polimorfismos da 3'UTR do gene *Nramp1* bovino entre as raças zebuínas e Holandesa. Estudos adicionais devem ser realizados para verificar a influência dos polimorfismos da 3'UTR do *Nramp1* bovino em infecções experimentais e naturais por *Brucella abortus*, que poderiam dar sustentação a emprego desses polimorfismos como marcadores de resistência contra brucelose bovina. O conhecimento sobre a frequência do genótipo em diversas raças bovinas pode ser muito útil no futuro para desenvolver estratégias de cruzamentos para a seleção de bovinos resistentes.

Capítulo 3

Correlação entre o polimorfismo da 3'UTR do gene *Nramp1* bovino e a ocorrência de aborto, alterações histopatológicas do feto e da vaca durante infecção experimental por *Brucella abortus*

Introdução

Diferenças na resposta individual de bovinos à infecção pela *B. abortus* têm sido relacionadas a fatores hereditários, em especial ao gene *Nramp1* (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*), cuja função está associada a capacidade dos macrófagos eliminarem patógenos intracelulares (Adams e Templeton, 1998). A resistência natural de bovinos à brucelose é uma característica hereditária associada a um polimorfismo na 3'UTR (região não-traduzida da extremidade 3') do gene *Nramp1* bovino, que pode ser evidenciado pela técnica de SSCA (*single strand conformational analysis*) (Feng et al., 1996; Adams e Templeton, 1998).

Conforme demonstrado no Capítulo 2, existem diferenças marcantes entre a raça Holandesa e as raças zebuínas nacionais na frequência dos alelos do *Nramp1*, mas a influência dessa diferença na resistência dessas raças contra brucelose não é conhecida. A influência do polimorfismo do gene *Nramp1* sob a ocorrência de aborto foi demonstrada apenas em um estudo experimental (Adams e Templeton, 1998) e não há estudos verificando esta influência sob a severidade das lesões histopatológicas decorrentes da infecção por *B. abortus*. O objetivo deste estudo é correlacionar a ocorrência de aborto e lesões histopatológicas no feto e na vaca com o polimorfismo da 3' UTR do gene *Nramp1* bovino em infecção experimental por *B. abortus*.

Material e Métodos

Foram selecionadas 42 vacas mestiças holandês-zebu, nulíparas com idade entre 20 e 30 meses, que foram mantidas na área experimental do Laboratório de Apoio Animal – Pedro Leopoldo - MG (LARA/MG); sendo divididas em três grupos: (i) Grupo 1: 17 animais vacinados quando jovem com vacina comercial B19; (ii) Grupo 2: 12 animais vacinados antes da gestação com vacina RB51 (Professional Biological Company, EUA) e (iii) Grupo 3: 13 animais não vacinados (NV).

A avaliação sorológica foi feita pelo teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), segundo Alton et al. (1988). Antes da inclusão dos animais no experimento foram realizadas duas provas sorológicas intervaladas de 30 dias. Nenhum animal apresentou sorologia positiva nos soros colhidos antes do desafio. Durante a fase de adaptação de quatro meses, os animais foram vermifugados com ivermectina (Coopermec, Schering-Plough Coopers, Cotia, Brasil) e vacinados contra raiva (Raivacel, Vallée, São Paulo, Brasil), contra IBR, BVD, PI-3, BRSV e *Leptospira interrogans* sorovarietades canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, hardjo, pomona e wollfi (CattleMaster 4 + L5, Pfizer, Guarulhos, Brasil) e contra *Clostridium chauvoei*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. sordelli*, *C. perfringens*, tipos C e D, (Fortress 7, Pfizer, Guarulhos, Brasil). Os animais foram alimentados durante a fase experimental com silagem de milho, caroço de algodão, polpa cítrica e sal mineral à vontade.

Os animais foram submetidos a protocolo de sincronização do cio para a obtenção do maior número possível de animais gestantes, no menor período de tempo possível. O protocolo hormonal utilizado consistiu na aplicação de um implante de progesterona intravaginal (CIDR, Pfizer, Guarulhos, Brasil), com retirada do implante nove dias depois associada a aplicação de um análogo da prostagladina F2 α (0,5mg de cloprostenol sódico – Ciosin, Schering-Plough Coopers, Cotia, Brasil). Nos animais classificados como acíclicos no momento da retirada do implante, além da PGF2 α , foi aplicada uma dose de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH – Conceptal, Intervet, São Paulo, Brasil). Exames ginecológicos dos animais foram realizados, periodicamente, por palpação retal ou por ultrassonografia. A detecção do cio foi feita através da observação visual de sinais externos de cio e uso de vacas androgenizadas com buçal marcador. Os animais foram observados 24 h/dia por um período de quatro dias. As inseminações artificiais foram realizadas no ato da detecção do cio e repetidas 12 horas após a primeira. O diagnóstico de gestação foi realizado pelo exame de ultrassonografia 35 dias após a inseminação. O sêmen utilizado na inseminação foi do touro Banal, da raça Nelore Mocho (Accelerated Genetics, EUA).

Após a sincronização do cio e inseminação artificial, as vacas foram inoculadas, entre seis e sete meses de gestação, com 50 μ l de uma suspensão contendo 3,0 x 10⁸ UFC/ml de *B. abortus*, amostra 2308 (gentilmente cedida pelo Dr. L. E. Samartino, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – INTA – Balcarce, Argentina) em cada saco conjuntival. As vacas foram monitoradas até o abortamento ou parição. Após o aborto ou parto, as vacas e os bezerros vivos foram sedados com Xilazina (Coopazine, Schering-Plough Coopers, Cotia, Brasil), eutanasiados por eletrocussão e, até 48 horas após o parto ou aborto, necropsiados. Fragmentos dos

linfonodos pré-escapular, supramamário, bronquial e ilíaco interno, baço, fígado, glândula mamária, carúncula e endométrio foram coletados das vacas. Dos fetos abortados e dos bezerros nascidos vivos, foram coletados fragmentos de pulmão, linfonodo bronquial, fígado, baço e outros órgãos quando havia alterações macroscópicas. Estes fragmentos foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% e processados para avaliação histopatológica. Amostras de todos estes órgãos foram congelados a -80°C para posterior extração de DNA. Além dos órgãos, leite, *swab* vaginal da vaca, conteúdo estomacal e *swab* retal do feto foram coletados assepticamente e conservados a -20°C para isolamento bacteriano.

Os fragmentos dos órgãos coletados em formol tamponado a 10% foram fixados por 24 horas e processados pelo método rotineiro de inclusão em parafina, cortados a 4 μ m de espessura e corados pela hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica (Luna, 1968). Alguns órgãos foram selecionados para identificação de *B. abortus* na lesão pela técnica de imunoistoquímica. Utilizou-se anticorpo policlonal de coelho anti-*B. abortus* na diluição 1:1000 (Santos et al., 1998), o kit universal streptoavidina-biotina peroxidase (LSAB, Dako, EUA) e o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako, EUA).

A extração de DNA foi feita a partir de fragmentos macerados de fígado pelo método do tiocianato de guanidina (Pitcher et al., 1989) e a genotipagem foi realizada por SSCA conforme metodologia previamente descrita (Horin et al., 1999; Barthel et al., 2000). A PCR foi feita conforme descrito no Capítulo 2. Amostra de DNA de bovino fenotipicamente e genotipicamente resistente previamente genotipada em um laboratório de referência (Dr. Garry Adams, Texas A&M University, College Station, TX) foi processada e

utilizada como controle para a especificidade da reação.

Fragmentos de órgãos colhidos para isolamento foram descongelados e macerados. O isolamento bacteriano foi feito em placas contendo ágar triptose adicionado de 5% de soro fetal bovino estéril e suplemento de antibióticos (meio de Farrell - *Brucella* Selective Supplement, Oxoid, Inglaterra). As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ por um período de até quatro dias. As colônias semelhantes às de *Brucella* sp. de todas as placas foram caracterizadas bioquimicamente (Mac Faddin, 1980; Alton, 1988).

A associação entre a ocorrência de aborto e o polimorfismo da 3'UTR do *Nramp1* foi verificada através do teste exato de Fischer. As alterações histopatológicas foram analisadas de diversas formas a fim de detectar possível associação entre lesões histopatológicas e o polimorfismo da 3'UTR do gene *Nramp1* bovino. A avaliação do score médio das lesões foi feita pelo

Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney. A associação entre a severidade das lesões e o polimorfismo da 3'UTR do *Nramp1* foi verificada através teste exato de Fischer. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa Graphpad Instat Software versão 3.05 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados e discussão

A distribuição dos genótipos resistente e susceptível está sumarizada na Tab. 1. A avaliação de correlação entre fenótipo, representado neste estudo por ocorrência de aborto ou intensidade de lesões, levou em consideração o genótipo materno. Embora os fetos e bezerros também tenham sido genotipados, permitindo a identificação do genótipo do touro utilizado na inseminação artificial. Todos os bezerros eram homozigoto GT14 ou heterozigoto GT13/GT14 indicando que o genótipo do touro era homozigoto GT14.

Tabela 1: Distribuição dos genótipos das vacas nos grupos experimentais.

	B19 ¹	RB51 ²	NV ³	Total
SSCA ^r	07	05	07	19
SSCA ^s	10	07	06	23

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Teste exato de Fischer

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13).

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14).

¹ animais vacinados quando jovem com vacina comercial B19.

² animais vacinados antes da gestação com vacina RB51.

³ animais não vacinados.

Dentre as 42 vacas estudadas, 12 (28,6%) abortaram, seis pariram bezerros prematuros fracos (14,3%) e 24 tiveram parto normal (57,1%). O número de vacas que abortaram, que pariram bezerros prematuros fracos, e de

vacas que pariram normalmente, por grupo experimental, é apresentado na Tab. 2. Foi isolada *B. abortus* em 27 (64,3%) das vacas, tendo sido isolada em todas as vacas que abortaram ou que pariram bezerros fracos.

Tabela 2: Número de vacas que abortaram e que pariram por grupo experimental.

Grupo experimental	Aborto	Bezerros fracos ¹	Bezerros saudáveis
Grupo B19 ²	03	03	11
Grupo RB51 ³	04	00	08
NV ⁴	05	03	05

¹ Bezerros prematuros (nascimento 15 dias antes da data prevista) que nasceram fracos.

² animais vacinados quando jovem com vacina comercial B19.

³ animais vacinados antes da gestação com vacina RB51.

⁴ animais não vacinados.

Não houve associação entre a ocorrência de aborto e nascimento de bezerros fracos com o polimorfismo dos alelos do gene *Nramp1* como demonstrado na Tab. 3. Isto significa que o aborto no terço final da gestação e nascimento de bezerros fracos, principais manifestações clínicas da brucelose bovina (Fitch, 2003), não estão associadas com o genótipo susceptível do *Nramp1* bovino. Desconsiderando-se o grupo, ou seja,

agrupando-se todas as vacas com base somente no genótipo sem considerar o histórico vacinal, as vacas com genótipo SSCA^r (n=19) tiveram 8 abortos ou nascimento de bezerros prematuros fracos (42,1%), enquanto as vacas SSCA^s (n=23) tiveram 10 abortos ou nascimento de bezerros prematuros fracos (43,5%), não havendo diferença significativa entre estas frequências (P>0,05).

Tabela 3: Frequência de aborto e nascimento de bezerros fracos segundo o fenótipo em vacas gestantes experimentalmente infectadas com *B. abortus*.

	B19 ²		RB51 ³		Controle ⁴	
	SSCA ^r	SSCA ^s	SSCA ^r	SSCA ^s	SSCA ^r	SSCA ^s
Aborto ¹	02 (28,6%)	04 (40,0%)	01 (16,7%)	03 (42,9%)	05 (71,42%)	03 (50,0%)
Bezerros saudáveis	05 (71,4%)	06 (60,0%)	05 (83,3%)	04 (57,1%)	02 (28,6%)	03 (50,0%)

Não houve diferença significativa P>0,05 Teste exato de Fisher.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13).

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14).

¹Inclui aborto e nascimento de bezerros prematuros fracos

² animais vacinados quando jovem com vacina comercial B19.

³ animais vacinados antes da gestação com vacina RB51.

⁴ animais não vacinados

À necropsia, as alterações macroscópicas mais significativas das vacas foram observadas nos úteros, que se encontravam distendidos e sem alterações no perimétrio. Na luz uterina havia quantidade variável de exsudato amarelo-amarronzado, floculento, com material necrótico e odor fétido (Fig. 4 e 5). As lesões macroscópicas da placenta não eram uniformes, sendo que alguns placentomas estavam aparentemente normais, enquanto outros estavam hemorrágicos e/ou com aspecto necrótico (Fig. 6 e 7). Em alguns casos a porção fetal da placenta ainda estava presente e os cotilédones afetados estavam friáveis, de coloração amarelada e recobertos por exsudato amarronzado. Os linfonodos superficiais e internos e, às vezes, o baço apresentava aumento de volume com intensidade variável. Lesões macroscópicas não foram observadas na glândula mamária e no fígado, bem como em outros órgãos. Os animais que abortaram apresentavam placentite necrótica intensa, mas a inflamação estava presente em vários animais que tiveram partos normais, embora nesses casos o processo inflamatório era de menor intensidade.

Os fetos abortados estavam autolisados (Fig. 8), contendo quantidade variável de líquido avermelhado no tecido subcutâneo e nas cavidades corporais. Dentre os fetos e bezerras fracos avaliados macroscopicamente, 12,5% (2/16) apresentaram alterações macroscópicas nos pulmões caracterizadas por áreas focais a difusas de coloração avermelhada a acinzentada e firmes a palpação e pleura recoberta por fibrina (Fig. 9 e 10). Em 25% dos animais (4/16) também foi observado exsudato fibrinoso no saco pericárdio (Fig. 11). Frequentemente, isto é em 37,5% dos animais (6/16), o único achado foi pleurite fibrinosa, sem alterações macroscópicas significativas no parênquima pulmonar e, em outros casos, pericardite fibrinosa foi o único achado macroscópico no feto

abortado. Em 37,5% dos animais (6/16) os órgãos abdominais, principalmente fígado e baço estavam recobertos por pequena quantidade de fibrina, caracterizada macroscopicamente como material filamentosso amarelado. A pneumonia é a lesão fetal mais frequentemente descrita em casos de aborto por brucelose (Adams, 2002), mas nem todos os fetos abortados têm pneumonia (López et al., 1984). Já peritonite e pericardite, que neste experimento foram mais frequentes que pneumonia, são pouco descritas.

Histologicamente, nas vacas, a lesão mais importante foi a placentite necrótica, que ocorreu em 95% dos casos (40/42) e foi caracterizada por necrose superficial a profunda da carúncula, associada à hemorragia e infiltrado neutrofílico, grumos bacterianos e restos de tecido fetal no lume uterino e nas criptas carunculares (Fig. 12). No pedúnculo caruncular havia infiltrado inflamatório perivascular constituído de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e histiócitos e, às vezes, granuloma com centro necrótico. Observou-se também endometrite multifocal a difusa em 95% das vacas (38/40), que foi caracterizada por ulceração multifocal do endométrio superficial, com acúmulo de restos celulares sobre a área ulcerada, edema, infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, predominantemente periglandular e perivascular e infiltração de neutrófilos no lume de glândulas endometriais (Fig. 14). Em alguns casos observou-se vasculite no endométrio (Fig. 15) e no pedúnculo caruncular. Em 50% (21/42) das vacas, na glândula mamária havia infiltrado linfocitário intersticial multifocal e neutrófilos dentro do lume glandular (Fig. 13) e, raramente, observou-se mastite neutrofílica difusa. Os linfonodos pré-escapulares, bronquial, íliaco interno e supramamário apresentaram grau variável de infiltração neutrofílica e histiocítica nos

seios medulares e para-corticais e hiperplasia linfóide (Fig 16). O baço também apresentou hiperplasia linfóide e infiltrado neutrofilico perifolicular. O fígado de poucos animais apresentou infiltrado linfo-histio-plasmocitário moderado na região portal e pequena quantidade de neutrófilos distribuídos difusamente ou em focos nos sinusóides.

Os fetos apresentavam atelectasia total, enquanto em vários bezerros foi observada atelectasia parcial. A pericardite e pleurite fibrinosas foram caracterizadas microscopicamente por intenso exsudado fibrinoso associado a linfócitos, plasmócitos e neutrófilos e congestão no pericárdio e na pleura visceral (Fig.17). Nos pulmões havia infiltrado neutrofilico multifocal nos broquíolos e alvéolos ou pneumonia intersticial multifocal associados (Fig. 18 e 19), correspondendo a 61,5% (24/39) dos

bezerros/fetos. Em alguns casos, havia vasculite e trombose. Foram observadas peri-esplenite em 25% (10/40) e peri-hepatite em 22,5% (9/40) dos fetos ou bezerros. Estas lesões foram caracterizadas histologicamente pelo acúmulo de linfócitos, neutrófilos e eritrócitos recobrimdo a cápsula do baço e do fígado, compatível com o achado macroscópico de peritonite. Em 55% dos casos (22/40) havia hepatite neutrofilica ou com infiltrado inflamatório misto, multifocal a difusa. O baço e o linfonodo bronquial apresentaram hiperplasia linfóide e infiltrado neutrofilico multifocal. Esplenite foi observada em 71% (27/38) e linfadenite em 56% (22/39) dos fetos ou bezerros. Em cortes histológicos de alguns órgãos selecionados com base nas alterações microscópicas, foi confirmada a presença da *B. abortus* nas lesões pela da técnica de imunoistoquímica, tanto nas vacas quanto nos fetos ou bezerros (Fig.20).

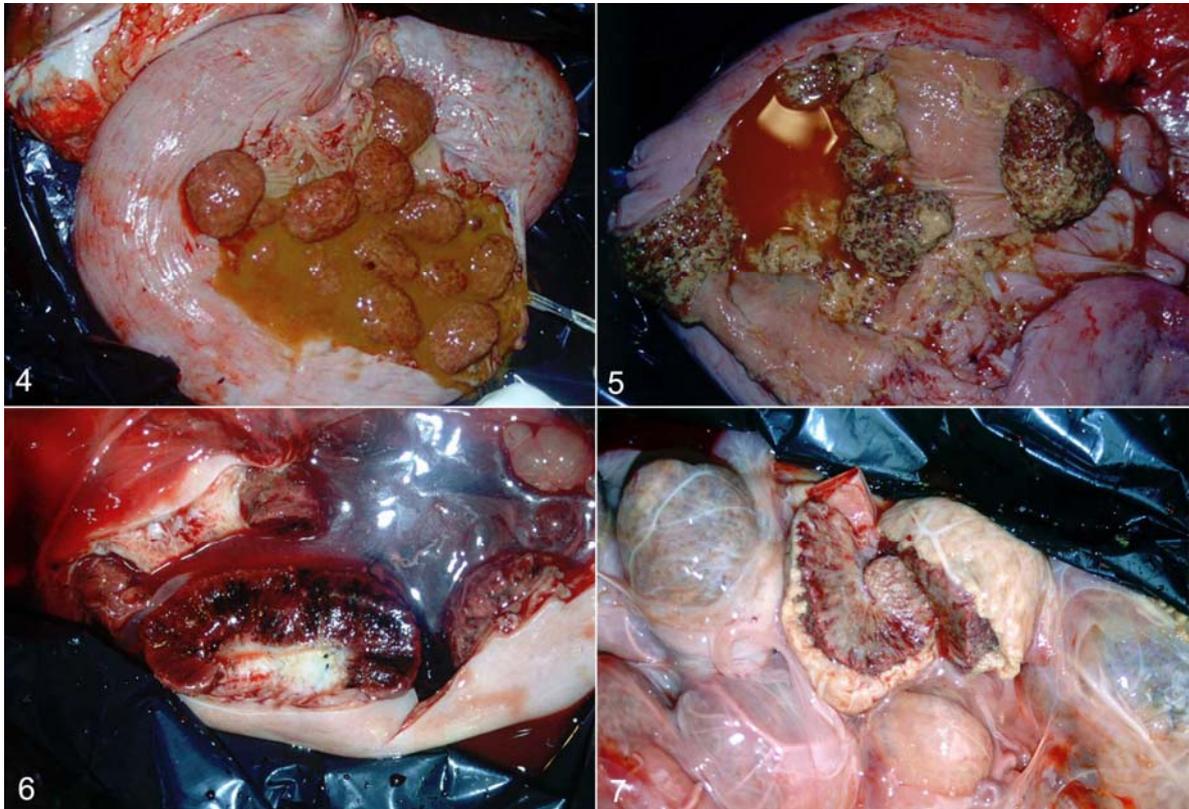


Figura 4: Vaca. Útero repleto com grande quantidade de exsudato amarelo-amarronzado e superfícies carunculares necróticas.

Figura 5: Vaca. Útero contendo exsudato amarronzado com material necrótico floculento amarelado no lume e recobrimdo a superfície caruncular.

Figura 6: Vaca. Corte sagital da carúncula. Hemorragia intensa e difusa na carúncula.

Figura 7: Vaca. Corte sagital da carúncula. Superfície caruncular recoberta por material necrótico e com anexos fetais ainda aderidos.



Figura 8: Piquete do experimento. Feto abortado em terço final de gestação em avançado estado de autólise.

Figura 9: Feto. Pleurite fibrinosa. Pleura parietal e visceral hemorrágicas e recobertas por material fibrinoso.

Figura 10: Feto. Pleurite fibrinosa. Pleura visceral recoberta por fibrina e pequena quantidade de líquido avermelhado na cavidade torácica.

Figura 11: Feto: Pleurite e pericardite fibrinosa. Saco pericárdio repleto de fibrina e focos de hemorragia do epicárdio. Pleura parietal com hiperemia e hemorrágica e a capa de fibrina que recobria a pleura visceral foi retirada.

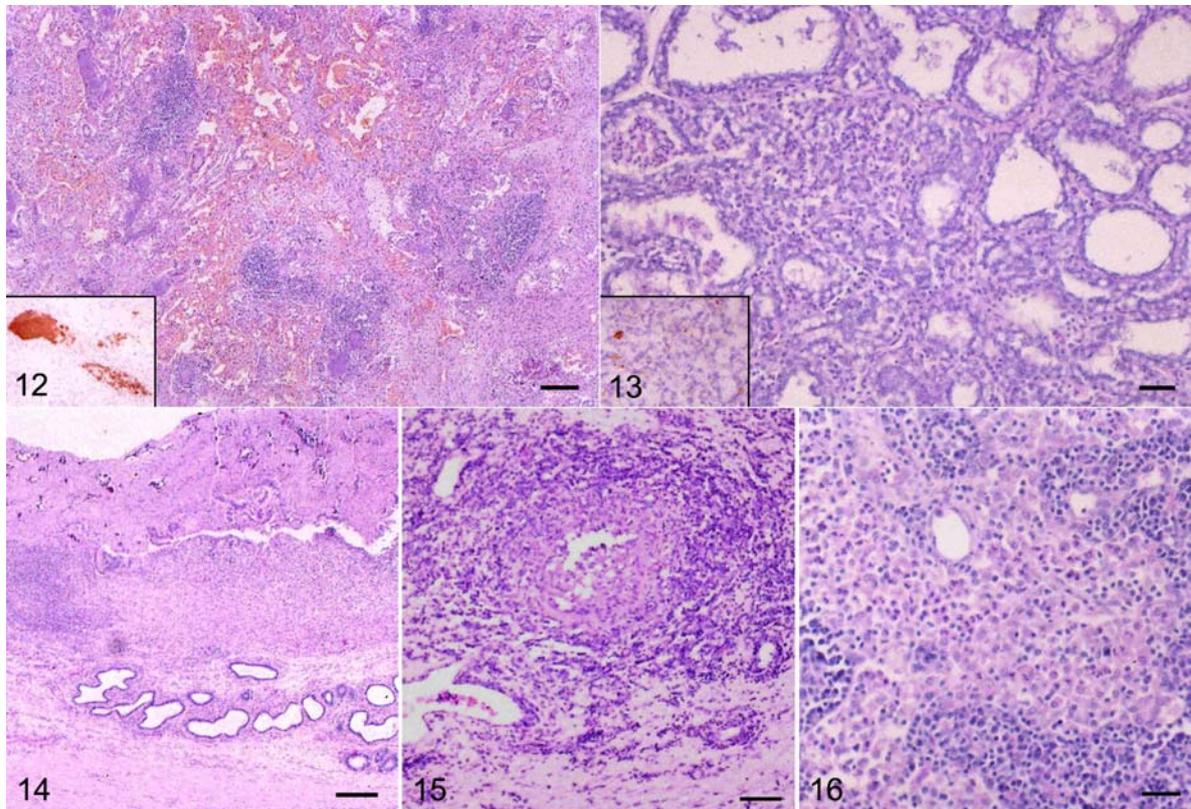


Figura 12: Vaca. Carúncula. Placentite necrótica intensa. Criptas carunculares com material necrótico, hemorragia multifocal, infiltrado inflamatório intenso e grande quantidade de grumos bacterianos de *Brucella abortus* marcados em marrom por imunistoquímica anti-*B. abortus* (detalhe). HE, Barra = 167 μ m

Figura 13: Vaca. Glândula mamária. Mastite mista intensa multifocal. Intenso infiltrado de linfócitos, macrófagos e neutrófilos no interstício e acúmulo de neutrófilos no lume de alguns ductos. Algumas células inflamatórias contêm bactérias intracitoplasmáticas marcadas em marrom pela imunistoquímica anti *B. abortus* (detalhe). HE. Barra = 50 μ m

Figura 14: Vaca. Endométrio. Endometrite intensa. Extensa área de erosão do epitélio endometrial com acúmulo de grande quantidade de exsudato com restos celulares e grumos bacterianos. Infiltrado inflamatório difuso e intenso na submucosa. HE. Barra = 250 μ m

Figura 15: Vaca. Endométrio. Vasculite. Degeneração fibrinóide da parede da arteríola associada a infiltrado inflamatório intenso mural e perivascular. HE. Barra = 100 μ m

Figura 16: Vaca. Linfonodo supramamário. Linfadenite supurada moderada multifocal associada a reticulocitose. Seios medulares repletos de macrófagos volumosos e com múltiplos focos de neutrófilos. HE. Barra = 33,5 μ m

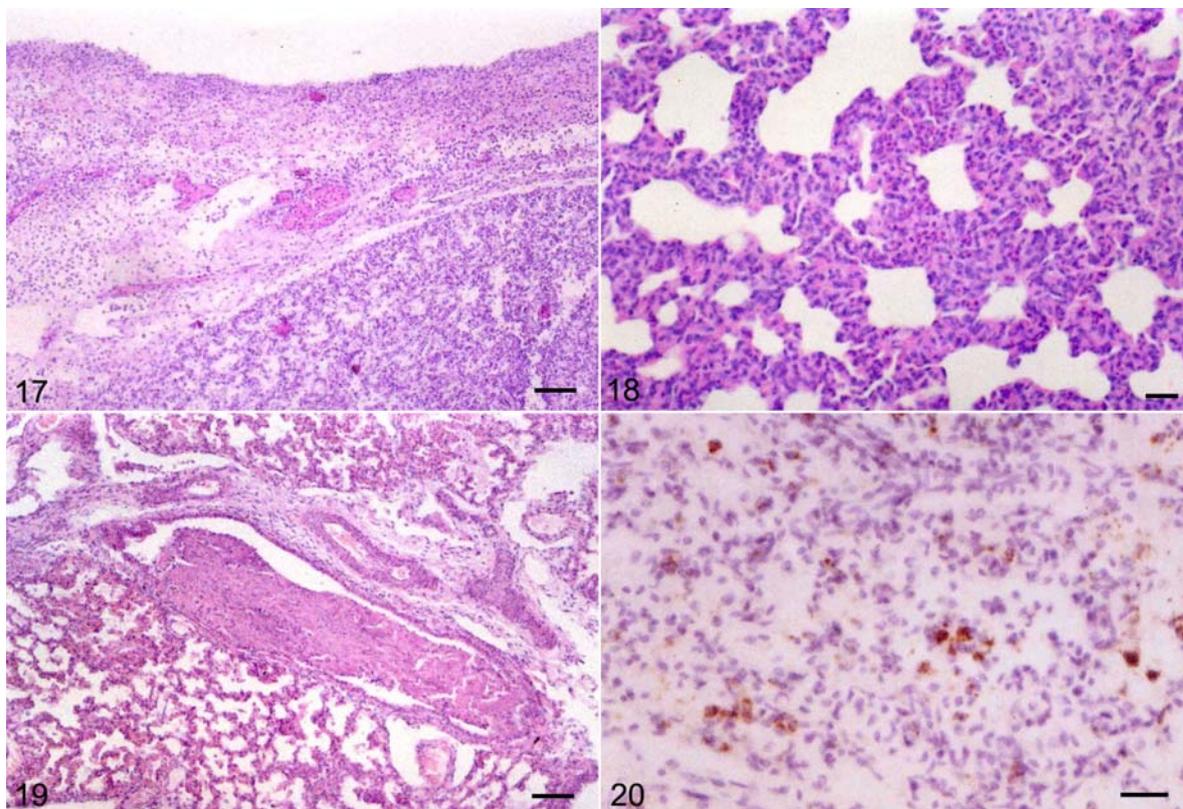


Figura 17: Feto. Pulmão. Pleurite supurada intensa. Espessamento e hiperemia da pleura associados a infiltrado neutrofilico intenso e difuso. HE. Barra = 100 μ m

Figura 18: Bezerro. Pulmão. Pneumonia intersticial multifocal. Espessamento acentuado da parede alveolar com grande quantidade de neutrófilos HE. Barra = 33,5 μ m

Figura 19: Bezerro. Pulmão. Broncopneumonia. Bronquíolo repleto de fibrina. Hiperemia e focos discretos de células inflamatórias no parênquima pulmonar. He. Barra = 80 μ m

Figura 20: Feto. Pulmão. Atelectasia total. Inúmeras bactérias *Brucella abortus* intracelulares e extracelulares em marrom. Imunoistoquímica anti-*B. abortus*. Barra = 25 μ m

Após a descrição e caracterização das lesões histopatológicas dos tecidos das vacas e dos bezerros, estas foram classificadas quando sua intensidade/severidade de inflamação e de reatividade dos folículos linfóides, no caso dos órgãos linfóides, em ausente (escore = 0), discreta (escore = 1), moderada (escore = 2) e intensa (escore = 3). Os escores médios de cada órgão e de cada animal avaliado foram comparados com os genótipos resistentes e susceptíveis do *Nramp1*.

Não houve associação entre a severidade das lesões histopatológicas e o polimorfismo da 3'UTR do gene *Nramp1*, exceto no caso da

intensidade do processo inflamatório no linfonodo supramamário das vacas do grupo NV, no qual as vacas com genótipo SSCA^r tiveram maior intensidade de inflamação, como demonstrado nas Tab. 4 e 5. Aparentemente, embora significativa, a diferença restrita a um linfonodo em um grupo experimental possivelmente seja consequência de variação aleatória, inclusive pelo fato de que linfadenite supramamária não é uma lesão representativa da doença. Por outro lado, a inflamação da placenta, que é a lesão mais importante na brucelose, não teve intensidade significativamente diferente entre os grupos (Tab. 4).

Tabela 4: Escores médios das lesões histopatológicas nas vacas dos grupos B19, RB51 e NV, subdivididas segundo o genótipo.

Grupo		Caruncula	Endométrio	Mama	Fígado	Baço	LSM		LPE		LBR		LII		
		I ¹	I	I	I	I	R ²	I	R	I	R	I	R	I	R
B19	SSCA ^r	2,43	2,00	0,43	0,86	0,71	1,28	0,43	1,43	0,43	1,86	0,29	1,00	0,29	0,86
	SSCA ^s	1,70	1,70	0,80	0,40	0,70	1,50	0,50	1,00	0,60	1,60	0,30	0,70	0,50	0,70
RB51	SSCA	1,4	1,2	0,4	0,8	1,4	1,8	0,40	1,40	0,40	2,40	0,25	1,25	0,40	1,00
	SSCA ^s	2,29	1,67	0,57	0,14	0,57	1,57	0,71	0,86	0,71	1,71	0,57	1,00	0,57	0,71
NV	SSCA ^r	1,86	1,71	0,71	0,29	1,29	2,29	1,43*	1,43	0,43	2,00	0,57	1,14	0,57	0,14
	SSCA ^s	1,83	2,20	1,00	0,83	1,00	1,50	0,17*	0,83	0,50	1,67	0,50	0,83	0,50	1,00

* Diferença estatisticamente significativa entre as médias (P=0,026) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Médias dos escores: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13).

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14).

¹ Inflamação.

² Reatividade dos folículos linfóides

LSM=linfonodo supramamário, LPE=linfonodo pré-escapular, LBR=linfonodo bronquial, LII=linfonodo ilíaco interno.

Tabela 5: Escores médios das lesões histopatológicas nos fetos das vacas dos grupos B19, RB51 e NV, subdivididos segundo o genótipo da vaca.

Grupo		Pulmão	Fígado	Baço		LBR	
		I ¹	I	I	R ²	I	R
B19	SSCA ^r	1,17	0,28	1,33	0,67	0,43	0,43
	SSCA ^s	0,70	0,80	1,20	0,50	1,10	0,20
RB51	SSCA ^r	0,80	0,80	1,20	1,00	1,50	0,25
	SSCA ^s	0,17	0,57	1,17	0,67	0,40	0,00
NV	SSCA ^r	1,33	1,00	1,33	0,83	1,20	0,40
	SSCA ^s	1,00	0,50	1,27	0,82	0,82	0,36

Não houve diferença significativa entre os grupos $P > 0,05$ teste Kruskal-Wallis

Médias dos escores: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13)

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14)

¹ Inflamação.

²Reatividade dos folículos linfóides

LBR=linfonodo bronquial

A intensidade das lesões histopatológicas não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais – B19, RB51

e NV (Tab. 6 e 7), indicando que a vacinação não teve influência sobre o escore médio das lesões histopatológicas.

Tabela 6: Escores médios das lesões histopatológicas nas vacas dos grupos experimentais.

Grupo	Carun	Endo	Mama	Fígado	Baço	LSM		LPE		LBR		LII		
	I ¹	I	I	I	I	R ²	I	R	I	R	I	R	I	R
B19	2,00	1,82	0,65	0,59	0,71	1,41	0,47	1,18	0,53	1,71	0,29	0,82	0,41	0,76
RB51	1,92	1,45	0,50	0,42	0,92	1,67	0,58	1,08	0,58	2,00	0,45	1,09	0,50	0,83
Controle	1,85	1,92	0,85	0,54	1,15	1,92	0,85	1,15	0,46	1,84	0,54	1,00	0,54	0,54

Não houve diferença significativa entre os grupos $P > 0,05$ teste Kruskal-Wallis

Médias dos escores: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso.

¹ Inflamação.

² Reatividade dos folículos linfóides

Carun=carúncula, Endo=endométrio, LSM=linfonodo supramamário, LPE=linfonodo pré-escapular, LBR=linfonodo bronquial, LII=linfonodo ilíaco interno

Tabela 7: Escores médios das lesões histopatológicas dos órgãos dos fetos dos grupos experimentais.

Grupo	Pulmão	Fígado	Baço		LBR	
	I ¹	I	I	R ²	I	R
B19	0,87	0,59	1,25	0,56	0,82	0,29
RB51	0,45	0,67	1,18	0,82	0,89	0,11
NV	1,09	0,73	1,36	0,91	1,10	0,60

Não houve diferença significativa entre os grupos $P > 0,05$ teste Kruskal-Wallis

Médias dos escores: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso.

¹ Inflamação.

² Reatividade dos folículos linfóides

LBR=linfonodo bronquial

Considerando-se a ausência de influência da vacinação sobre a intensidade das lesões, uma segunda avaliação da intensidade das lesões foi realizada dividindo os 42 animais

somente com base no genótipo. Neste caso, também não houve diferença significativa como demonstrado nas Tab. 8 e 9.

Tabela 8: Escores médios das lesões histopatológicas nas vacas dos grupos com genótipo resistente e susceptível à brucelose.

Genótipo	Carun	Endo	Mama	Fígado	Baço		LSM		LPE		LBR		LII	
	I ¹	I	I	I	I	R ²	I	R	I	R	I	R	I	R
SSCA ^r	1,95	1,68	0,53	0,63	1,10	1,79	0,79	1,42	0,42	2,05	0,39	1,11	0,42	0,63
SSCA ^s	1,91	1,81	0,78	0,43	0,74	1,52	0,48	0,91	0,61	1,65	0,43	0,83	0,52	0,78

Não houve diferença significativa entre os grupos $P > 0,05$ teste Mann-Whitney

Médias dos escores: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13).

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14).

¹ Inflamação.

²Reatividade dos folículos linfóides

Carun=carúncula, Endo=endométrio, LSM=linfonodo supramamário, LPE=linfonodo pré-escapular, LBR=linfonodo bronquial, LII=linfonodo ilíaco interno

Tabela 9: Escores médios das lesões histopatológicas nos fetos segundo o genótipo das vacas.

Genótipo	Pulmão	Fígado	Baço		LBR	
	I ¹	I	I	R ²	I	R
SSCA ^r	0,94	0,47	1,31	0,87	0,87	0,50
SSCA ^s	0,73	0,78	1,23	0,64	0,95	0,20

Não houve diferença significativa entre os grupos $P > 0,05$ teste Mann-Whitney

Médias dos escores: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13)

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14)

¹ Inflamação.

²Reatividade dos folículos linfóides

LBR=linfonodo bronquial

A influência dos polimorfismos do *Nramp1* sobre a severidade das lesões causadas pela infecção por *B. abortus* também foi avaliada qualitativamente por análise de distribuição

de frequência. Não houve associação entre a ausência de lesão histopatológicas nas vacas (Tab. 10) ou nos bezerros (Tab. 11) e o genótipo resistente.

Tabela 10: Freqüência de ausência de lesões histopatológicas em diferentes órgãos das vacas com genótipo resistente e susceptível à brucelose.

Genótipo	Carun	Endo	Mama	Fígado	Baço		LSM		LPE		LBR		LII	
	I ¹	I	I	I	I	R ²	I	R	I	R	I	R	I	R
SSCA ^r	01 (5,3%)	02 (10,5%)	11 (57,9%)	08 (42,1%)	05 (26,3%)	01 (5,3%)	09 (47,4%)	04 (31,1%)	12 (63,7%)	01 (5,3%)	11 (61,2%)	03 (16,7%)	11 (57,9%)	11 (57,9%)
SSCA ^s	01 (4,3%)	0 (0%)	10 (43,5%)	14 (60,9%)	09 (39,1%)	01 (4,3%)	13 (56,5%)	08 (34,8%)	11 (47,8%)	02 (8,7%)	14 (60,9%)	07 (30,4%)	12 (52,2%)	08 (34,8%)

Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos SSCA^r e SSCA^s (P>0,05) - Teste exato de Fisher.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13), n=19, exceto na coluna LBR (n=18).

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14), n=23, exceto na coluna Endo (n=21).

¹ Inflamação.

² Reatividade dos folículos linfóides

Carun=carúncula, Endo=endométrio,

LSM=linfonodo supramamário, LPE=linfonodo pré-escapular, LBR=linfonodo bronquial, LII=linfonodo ilíaco interno

Tabela 11: Frequência de ausência de lesões histopatológicas em diferentes órgãos dos fetos conforme o genótipo das vacas.

Genótipo	Pulmão	Fígado	Baço		LBR	
	I ¹	I	I	R ²	I	R
SSCA ^r	05 (31,2%)	09 (52,9%)	05 (31,2%)	06 (37,5%)	08 (50%)	10 (62,5%)
SSCA ^s	10 (4,5%)	09 (39,1%)	06 (27,3%)	11 (50%)	07 (35%)	17 (85%)

Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos SSCA^r e SSCA^s (P>0,05) - Teste exato de Fisher.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13), n=16, exceto na coluna Fígado (n=17).

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14), n=22, exceto nas colunas Fígado (n=23) e LBR (n=20).

¹ Inflamação.

² Reatividade dos folículos linfóides

LBR=linfonodo bronquial

Também foi avaliada a frequência da ocorrência de aborto e lesões histopatológicas, associadas com o isolamento bacteriano entre as vacas com diferentes genótipos. Nesse caso o fenótipo susceptível foi definido como ocorrência de aborto, lesões e isolamento de *B. abortus*. A resistência e susceptibilidade a um patógeno podem ser classificadas de acordo com a severidade da doença induzida no animal ou de acordo com isolamento do agente nas lesões ou ambos. A associação dos dois critérios cria três classes de animais: (i) infectado e doente, (ii) infectado e sadio e (iii) não infectado e sadio (Templeton et al, 1988). Os animais infectados (isolamento bacteriano em algum tecido da vaca) e

doentes (aborto ou nascimento de bezerro fraco e inflamação moderada a intensa da placenta) foram considerados animais naturalmente susceptíveis e animais não infectados (ausência de isolamento) e sadios (parto normal e sem lesões histopatológicas significativas) foram considerados animais fenotipicamente resistentes. Os animais que não apresentavam estes critérios associados, não se enquadraram em nenhum dos dois grupos e foram excluídos desta análise. Mesmo com a associação destes critérios para definição do fenótipo resistente, não houve associação entre o fenótipo e o genótipo resistente (SSCA^r), como demonstrado na Tab. 12.

Tabela 12: Associação dos fenótipos resistente* e susceptível com os alelos do gene *Nramp1*.

	SSCA ^r	SSCA ^s
Fenótipo resistente (n=08)	05 (62,5%)	03 (37,5%)
Fenótipo susceptível (n=14)	07 (50%)	07 (50%)

Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos $P > 0,05$

*O fenótipo resistente foi caracterizado pela associação de ausência de aborto e de lesões e não isolamento de *B. abortus* dos tecidos. O fenótipo susceptível foi caracterizado pela ocorrência de aborto e de lesões com isolamento de *B. abortus*.

SSCA^r = genótipo resistente (homozigoto GT13)

SSCA^s = genótipo susceptível (homozigoto GT14 e heterozigoto GT13/GT14)

No presente estudo foram utilizadas várias formas para verificação da associação entre características de resistência à brucelose e o genótipo resistente, não tendo sido identificada nenhuma correlação entre o genótipo supostamente resistente e características fenotípicas de resistência. Estes dados contrastam com resultados previamente publicados que demonstram a influência dos polimorfismos da 3'UTR do gene *Nramp1* bovino sobre a resistência natural contra brucelose, porém as informações previamente publicadas são baseadas em um estudo de infecção experimental com número reduzido de animais (Adams e Templeton, 1998) e em um estudo laboratorial utilizando macrófagos de camundongos transfectados com alelos do gene *Nramp1* bovino (Barthel et al., 2001). Este estudo *in vitro* demonstra que a transfecção do alelo resistente GT13 para linhagem celular de macrófago RAW264.7 resulta na diminuição da sobrevivência intracelular da *B. abortus*. Contudo, não é considerada a influência do *Nramp1* da RAW264.7 sob a resistência (Barthel et al., 2001).

Embora vários estudos em bovinos demonstrem que os macrófagos de vacas naturalmente resistentes *in vitro* possuem maior efeito inibitório sobre a multiplicação

intracelular da *B. abortus* em comparação com macrófagos de vacas naturalmente susceptíveis (Harmon et al., 1989; Price et al., 1990; Qureshi et al., 1996), a resistência nesses casos foi baseada em características fenotípicas e não em polimorfismos do *Nramp1*. É necessária a avaliação da influência do polimorfismo da 3'UTR do *Nramp1* bovino sob controle da replicação da *B. abortus* em macrófagos bovinos para determinar se essa capacidade de controlar a replicação bacteriana está sob a influência do polimorfismo da 3'UTR do gene *Nramp1*.

Por outro lado, estudo realizado por Guilloteau et al. (2003) demonstra que a diferença no controle da infecção *B. melitensis* nas diferentes linhagens de camundongos não está associado com o polimorfismo e expressão do gene *Nramp1* nesta espécie. Na infecção por *B. abortus*, macrófagos de camundongos têm capacidade de controlar a multiplicação na fase inicial da infecção, mas de forma indistinta entre as linhagens resistentes e susceptíveis (Sathiyaseelan et al., 2000). Além disso, tanto a linhagem resistente à infecção por *B. abortus* (C57BL10) quanto a linhagem susceptível (BALB/c) apresentam o genótipo susceptível do gene *Nramp1*. A resistência em camundongos a *B. abortus*

está associada a diferença na expressão de citocinas responsáveis pela ativação de macrófagos, como o IFN γ (revisado por Baldwin e Parent, 2002).

Conclusão

Não houve associação entre os polimorfismos da 3'UTR do gene *Nramp1*

bovino e a ocorrência de aborto e lesões histopatológicas devido a infecção experimental por *B. abortus* em vaca gestantes. Estudo adicional deve ser realizado para verificar influência dos polimorfismos da 3'UTR do *Nramp1* bovino em infecções naturais por *B. abortus*, para certificar que estes polimorfismos não são úteis como marcadores de resistência contra brucelose bovina.

Capítulo 4

Correlação entre a ocorrência de infecção natural por *Brucella abortus* e os polimorfismos da 3'UTR do gene *Nramp1*

Introdução

Em bovinos, a resistência natural à *B. abortus* tem influência hereditária e a frequência de genótipos resistentes pode ser aumentada por seleção genética (Adams e Templeton, 1995). O polimorfismo na 3'UTR (região não-traduzida da extremidade 3') do gene *Nramp1* (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*) bovino (Feng et al, 1996), evidenciado pela técnica de SSCA (*Single Strand Conformational Analysis*), está associado com a resistência natural de animais não vacinados a brucelose (Adams e Templeton, 1998). Este polimorfismo está associado à variação no número de dinucleotídeos GT (GTn), além da ocorrência de substituição do nucleotídeo T por G (Horín et al., 1999). A identificação de marcadores genéticos, usualmente polimorfismos de microsátélites, ligados ao alelo resistente do *Nramp1* bovino pode ser uma ferramenta importante na identificação de animais resistentes em um rebanho para futura seleção genética (Templeton e adams, 1988; Skamene et al., 1998).

Embora exista diferença na frequência do polimorfismo do *Nramp1* entre as raças Holandesa e Zebu sendo a frequência do genótipo resistente, homozigoto GT13, com a frequência de 100% na raça Holandesa (Capítulo 2), não há indícios de que esta raça seja mais resistente a brucelose que as raças zebuínas. A influência do gene *Nramp1* bovino na resistência natural à brucelose é baseada em um estudo de infecção experimental (Adams e Templeton, 1998) e em um estudo *in vitro* (Barthel et al., 2001). No estudo experimental descrito no Capítulo 3, não foi detectado associação entre o polimorfismo na 3'UTR do gene *Nramp1*

bovino com a ocorrência de aborto e severidade das lesões histopatológicas devido a infecção por *B. abortus*. Contudo, não há estudos sobre a influência dos polimorfismos na 3'UTR do gene *Nramp1* bovino sobre a resistência natural à brucelose em rebanhos naturalmente infectados. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a influência do polimorfismo na 3'UTR do *Nramp1* sobre a resistência natural à brucelose bovina em condições de infecção natural a campo.

Material e Métodos

Foi identificada uma propriedade de gado de leite, mestiço, sem informação sobre vacinação contra brucelose, com histórico de elevada taxa de aborto e grande número de animais sorologicamente positivos para *B. abortus*. Do rebanho desta propriedade, foram selecionadas 100 vacas lactantes. Dentre elas, foram identificadas nove vacas em período pós-parto ou pós-aborto (com no máximo até 30 dias pós-parto ou pós-aborto), que foram submetidas à coleta de swab vaginal para isolamento de *Brucella* sp. Das 100 vacas foram coletadas amostras de sangue total da veia coccígea, com anticoagulante EDTA dissódico, para extração de DNA, além de amostras de sangue sem anticoagulante para exames sorológicos.

O isolamento e a identificação de *Brucella* sp. foram realizados segundo Alton et al. (1988). O teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) foram os testes sorológicos realizados para a identificação de animais infectados no rebanho, sendo o AAT, o teste de triagem e o 2-ME, o teste

confirmatório de acordo com o preconizado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT (Brasil, 2004). Ambos os testes são baseados na aglutinação de anticorpos do soro com antígeno de *Brucella* sendo o AAT um teste com sensibilidade alta e o 2-ME um teste de sensibilidade e especificidade elevadas (Nielsen, 2002). A extração de DNA do sangue total foi feita pelo método do tiocianato de guanidina (Pitcher et al., 1989) e a genotipagem foi realizada por SSCA conforme metodologia previamente descrita (Horin et al., 1999; Barthel et al., 2000) – ver material e métodos do Capítulo 2.

Para a genotipagem, foi utilizada uma amostra de 50ng de DNA de cada animal e iniciadores específicos para a amplificação da 3' UTR pela reação de PCR com base na metodologia previamente publicada (Barthel et al., 2000). A PCR foi feita conforme descrito no Capítulo 2. Amostra de DNA de bovino fenotipicamente e genotipicamente resistente previamente genotipada em um laboratório de referência (Dr. Garry Adams, Texas A&M University, College Station,

TX) foi processada e utilizada como controle para a especificidade da reação.

A análise estatística foi feita pelo teste exato de Fischer usando o Graphpad InStat Software versão 3.05 (Graphpad Software Inc., San Diego, Califórnia, USA).

Resultados e discussão

Foi isolada *Brucella* sp. de dois dos nove *swabs* vaginais. Os dois animais positivos no isolamento foram uma vaca com 14 dias pós-parto e outra com cinco dias pós-aborto. A identificação do isolado do *swabs* vaginais como *B. abortus* foi feito através de testes bioquímicos (Mc Faddin, 1980; Alton et al., 1988), sendo os resultados sumarizados na Tab. 13. O isolamento bacteriano, associado ao alto percentual de animais soropositivos, é suficiente para caracterizar a *B. abortus* como uma causa de aborto neste rebanho, pois este é o método de referência para diagnóstico definitivo de brucelose (Nicoletti, 1980; Poester et al., 2005).

Tabela 13: Tipificação das amostras isoladas dos *swabs* vaginais.

Amostras	GRAM	ACR	CAT	OXI	URE	NIT	CO ₂	H ₂ S	TIO	FUC	CIT	MOT	IND
<i>B.abortus</i>	negativo	- ¹	+ ²	+	+	+	V ³	V	V	V	-	-	-
Vaca 24	negativo	-	+	+	+	+	sim	+	-	+	-	-	-
Vaca 174	negativo	-	+	+	+	+	sim	+	-	+	-	-	-

GRAM=coloração pelo gram, ACR=teste da acriflavina, CAT=teste da catalase, OXI=teste da oxidase, URE=teste da urease após 30 minutos, NIT=prova da redução do Nitrato, CO₂=Exigência de CO₂ para crescimento, H₂S=Produção de H₂S, TIO=crescimento na presença de tionina, FUC=crescimento na presença de fucsina, CIT=teste do citrato, MOT= prova de motilidade, IND= teste do Indol.

¹negativo, ²positivo, ³variável com o biovar.

Na sorologia, dos 100 animais, 64 (64%) tiveram resultado positivo nos dois testes sorológicos (AAT e 2-ME) e o restante dos animais (36%) foi negativo no AAT. De acordo com PNCEBT (Brasil, 2004), uma vaca adulta é considerada infectada por *Brucella* sp. quando for positiva no AAT e apresentar título a partir da diluição 1:25 completo no 2-ME. Apesar de não ter conhecimento do histórico de vacinação desse rebanho, a prova 2-ME exclui animais com títulos vacinais devido ao período preconizado de vacinação contra brucelose com vacina B19, restrito as fêmeas com três a oito meses de idade (Brasil, 2004). A vacinação das fêmeas é realizada nesta idade para que ocorra a redução do nível de anticorpos vacinais antes da maturidade sexual e evitar detecção nas provas sorológicas (Poester et al., 2005). Por esta razão, os 64 animais sorologicamente positivos foram considerados infectados por *Brucella* sp., pois o título mais baixo observado no 2-ME foi na diluição 1:50 incompleto e 58% (37/64) dos animais obtiveram titulação máxima utilizada (diluição 1:200). Baseando-se no histórico de aborto, isolamento de *B. abortus* e elevada percentagem de animais sorologicamente positivos, sendo a maioria com título máximo da prova do 2-ME, ficou caracterizado que o rebanho encontrava-se infectado por *B. abortus* e que a brucelose era uma causa muito importante de aborto no rebanho estudado.

Um ponto importante que deve ser considerado na avaliação da resistência natural a doença é garantir que os animais foram expostos igualmente ao agente (Templeton et al., 1988). Obviamente, isto só é possível em infecções experimentais conforme a avaliação descrita no Capítulo 3. O objetivo neste estudo é avaliar a resistência natural contra brucelose a campo onde não é possível garantir a exposição de todos os animais ao agente de forma homogênea. Por outro lado, o isolamento de *B. abortus* e sorologia positiva em 64% dos

animais implicam em grau de desafio elevado neste rebanho e como o sistema de criação é semi-intensivo, sem separação dos animais em grupos, onde maioria dos animais tem contato direto com animais infectados, é muito provável que todos os animais do rebanho tenham tido contato com o agente. Isto porque as principais fontes de infecção para vacas são secreções uterinas, fetos abortados e restos placentários infectados devido ao hábito de se lambelem e comerem os restos placentários (Nicoletti, 1980; Silva et al., 2005).

O critério utilizado para caracterizar a susceptibilidade ou resistência natural das vacas à brucelose bovina, neste estudo, foi o diagnóstico sorológico. De acordo com resultados sorológicos, os 100 animais foram divididos em dois grupos: vacas naturalmente resistentes (sorologia negativa) e vacas naturalmente susceptíveis (sorologia positiva). Em estudos realizados por Harmom et al. (1989) e Price et al. (1990), o fenótipo de uma vaca resistente à brucelose é caracterizado pela sorologia negativa ou baixa e transiente, não ocorrência de aborto e isolamento negativo para *B. abortus* no *swab* vaginal, leite ou restos placentários. Já as vacas com fenótipo susceptível abortam, apresentam sorologia positiva para brucelose e o isolamento de *B. abortus* é positivo no leite, no *swab* vaginal ou restos placentários.

A ocorrência de aborto e o isolamento de *B. abortus* não foram utilizados como critérios de classificação, pois a maioria dos animais não estava em período pós-parto ou pós-aborto que permitissem o isolamento do agente e, além disso, o rebanho estudado não possuía escrituração zootécnica adequada, o que impediu acesso confiável ao histórico prévio de aborto. A eliminação da bactéria logo após o parto ou aborto em secreções uterinas é elevada nos 15 primeiros dias diminuindo rapidamente quando fluidos e membranas fetais não estão mais presentes (Nicoletti, 1980). Além disso, este foi um estudo da ocorrência da brucelose bovina

feito a campo onde nem todos animais infectados abortam, pois a manifestação do aborto nesta doença depende da idade, do estado reprodutivo, do estado imunológico dentre outros fatores (Adams, 2002). Aproximadamente 70% dos animais infectados abortam na primeira parição podendo voltar a ocorrer aborto nas gestações subseqüentes, porém com uma freqüência muito mais baixa (Nicoletti, 1980).

Em relação ao polimorfismo da 3'UTR do gene *Nramp1*, os animais genotipicamente resistentes (SSCA^r) foram identificados como homozigotos 175pb no gel de poliacrilamida corado pela prata, correspondendo ao alelo resistente GT13. E os animais genotipicamente susceptíveis

(SSCA^s) foram identificados como heterozigotos (177pb e 175pb ou 179pb e 175pb) ou homozigotos 177pb correspondendo aos alelos susceptíveis GT14 e GT15 (Adams e Templeton, 1998; Barthel et al., 2001) (Fig. 21). Dos 100 animais genotipados, 85 (85%) foram SSCA^r e apenas 15 (15%) foram SSCA^s. A freqüência elevada do genótipo resistente deve-se ao fato de que os animais estudados eram de um rebanho de gado mestiço com grau de sangue predominantemente variando de 1/2 até 7/8 da raça Holandesa. Como demonstrado no Capítulo 2, a raça Holandesa apresentou homogeneidade do genótipo homozigoto GT13 e por esta razão, cruzamentos com animais da raça Holandesa favorece a freqüência do genótipo resistente, homozigoto GT13, na progênie.

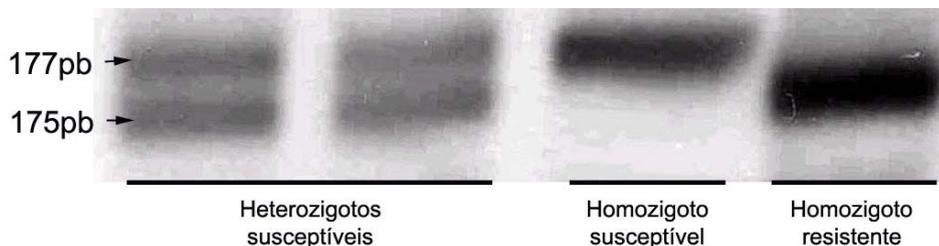


Figura 21. Resultado representativo do SSCA para identificação dos alelos do gene *Nramp1*. As setas indicam produtos do tamanho 175 e 177 pares de base correspondendo a GT13, GT14 respectivamente.

Não foi observada, neste rebanho, a associação entre a freqüência de fenótipo resistente e a freqüência do genótipo resistente (Tab. 14). Além disso, os dois animais positivos no isolamento bacteriano foram sorologicamente positivos com título na diluição 1:200, porém apresentaram genótipo resistente (homozigoto GT13). Outra forma utilizada para verificar a associação entre a resistência natural à brucelose e o genótipo resistente foi

correlacionar a freqüência do genótipo resistente (SSCA^r) com os títulos sorológicos obtidos na prova do 2-ME. Considerando-se a hipótese de que os animais sorologicamente negativos seriam os mais resistentes e os com maior título sorológico mais susceptíveis, não houve diferença significativa na ocorrência de genótipo resistente entre os dois grupos (Fig 22).

Tabela 14. Correlação entre frequência de sorologia negativa ou positiva com a frequência dos diferentes alelos do gene *Nramp1*.

	SSCA ^r	SSCA ^s
Sorologia negativa (n=36)	31 (86%)	05 (14%)
Sorologia positiva (n=64)	54 (84%)	10 (16%)

Não foram observadas diferenças significativas nos genótipos dos grupos fenotipicamente resistentes ou susceptíveis ($P>0,05$).

SSCA^r = genótipo resistente

SSCA^s = genótipo susceptível

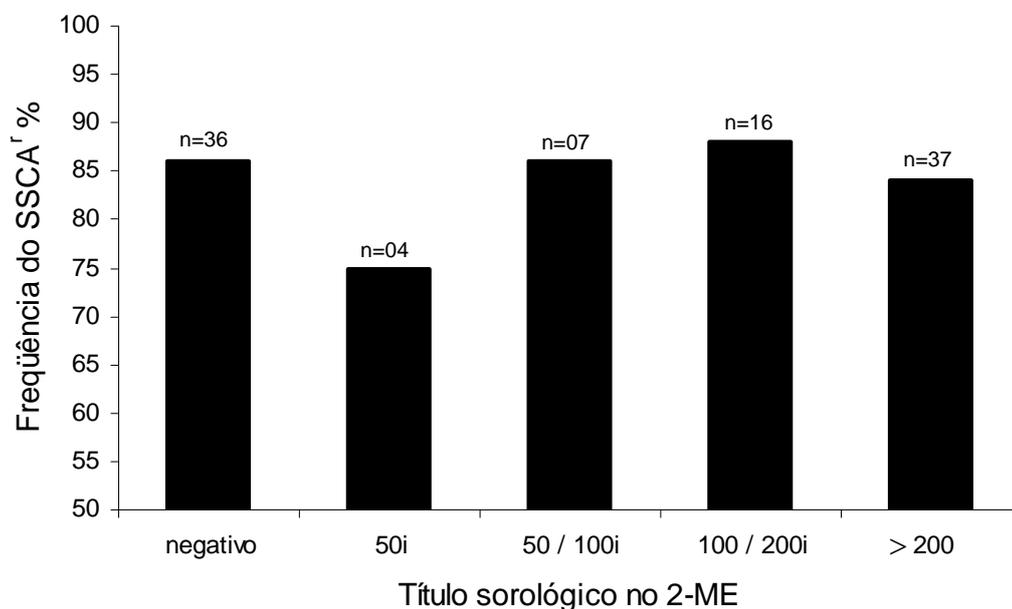


Figura 22. Correlação entre a frequência do genótipo resistente (SSCA^r) com os diferentes títulos sorológicos observados no 2-ME. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$).

O conjunto de dados obtidos nesse estudo não evidenciaram qualquer associação entre os polimorfismos da 3'UTR do *Nramp1* e resistência a infecção natural por *B. abortus* em condições de campo. Estes resultados corroboram os dados apresentados no Capítulo 3 e contrastam com dados previamente publicados que demonstram a

associação entre polimorfismos da região 3'UTR do gene *Nramp1* bovino e a resistência natural à brucelose. Contudo, tais informações são baseadas primariamente em um estudo de infecção experimental com número reduzido de animais (Adams e Templeton, 1998) e em um estudo laboratorial utilizando macrófagos de

camundongos transfectados com alelos do gene *Nramp1* bovino (Barthel et al., 2001). Por outro lado, Barthel et al. (2000) não detectaram associação entre o polimorfismo do gene *Nramp1* e infecção natural a campo por *Mycobacterium bovis*, outro patógeno intracelular no qual a resistência natural dos camundongos está também associada ao gene *Nramp1* (Vidal et al., 1993). Qureshi e colaboradores (1996) demonstraram que o fenótipo resistente à brucelose está associado à capacidade dos macrófagos em limitar o crescimento de *B. abortus* e também de *M. bovis*. Portanto, seria esperada correlação entre o genótipo e o fenótipo resistente tanto no caso da brucelose quanto na tuberculose em condições de infecção natural. Estudos recentes também não detectaram associação entre o polimorfismo do gene *Nramp1* e susceptibilidade ou resistência à brucelose no camundongo (Guilloteau, et al., 2003) e no homem (Bravo et al., 2005).

A ausência de associação entre os polimorfismos da 3'UTR do gene *Nramp1* e a resistência natural à brucelose bovina, tanto em vacas experimentalmente infectadas (Capítulo 3) quanto em vacas naturalmente infectadas em condições de

campo, sugere que a caracterização do genótipo resistente com base nos alelos avaliados neste estudo, não serve para identificar animais naturalmente resistentes à brucelose bovina. Portanto, a avaliação dos polimorfismos da 3'UTR do gene *Nramp1*, isoladamente, não é suficiente para caracterizar a resistência genética a brucelose, ou seja, tal procedimento não teria utilidade prática como um marcador de resistência. Estes resultados também indicam que provavelmente outros genes estão envolvidos na resistência natural à brucelose bovina (Adams et al., 1995; Adams et al., 1996).

Conclusão

Com base nestes dados, o alelo do gene *Nramp1* previamente apontado como associado à resistência não apresentou correlação com o fenótipo de animais naturalmente resistentes à brucelose bovina em condições a campo e, portanto, não pode ser utilizado como marcador genético de resistência à brucelose em condições de campo.

Referências Bibliográficas

- ABLES, G.P., NISHIBORI, M.; KANEMAKI, M.; WATANABE, T. Sequence analysis of the NRAMP1 genes from different bovine and buffalo breeds. *J. Vet. Med. Sci.*, v.64, n.11, p.1081-83, 2002.
- ACKERMANN, M.R.; CHEVILLE, N.F.; DEYOE, B.L. Bovine ideal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Pathol.*, v.25, p.28-35, 1988.
- ADAMS, LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.553-61, 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. Epiz.*, v.17, p.200-19, 1998.
- ADAMS, L.G.; TEMPLETON, J.W. Identifying candidate genes for natural resistance to brucellosis. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.*, Nevada, p.111-16, 1995.
- ALTET, L., FRANCINO, O., SOLANO-GALLEGO, L., RENIER, C., SÁNCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect. Immun.*, v.70, n.6, p.2763-71, 2002.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the Brucellosis laboratory.*, Paris: INRA, 1988. 190p.
- ANDERSON, TD; MEADOR, VP; CHEVILLE, NF. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Vet. Pathol.*, v.23, p.219-26, 1986a.
- ANDERSON, TD; MEADOR, VP; CHEVILLE, NF. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet. Pathol.*, v.23, p.227-39, 1986b.
- ATKINSON, P.G.P.; BARTON, C.H. High level expression of *Nramp1*^{G169} in RAW264.7 cell transfectants: analysis of intracellular iron transport. *Immunology*, v.96, p.656-62, 1999.
- BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.*, v.90: p.367-82, 2002.
- BARGER, I.A. Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. Review. *Vet. Parasitol.*, v.32, p.21-35, 1989.

BARTHEL, R.; FENG, J.; PIEDRAHITA, J.A.; McMURRAY, D.N.; TEMPLETON, J.A.; ADAMS, L.G. Stable transfection of bovine Nramp1 gene into murine RAW264.7 cells: Effect on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun.*, v.69, p.3110-19, 2001.

BARTHEL, R.; PIEDRAHITA, J.A.; McMURRAY, D.N.; PAYEUR, J.; BACA, D.; GÜEMES, F.S.; PERUMAALLA, V.S.; FICHT, T.A.; TEMPLETON, J.W.; ADAMS, L.G. Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.1140-44, 2000.

BARTON, C.H.; WHITE, J.K.; ROACH, T.I.; BLACKWELL, J.M. NH₂-terminal sequence of macrophage-expressed natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) encodes a proline/serine-rich putative Src homology 3-binding domain. *J. Exp. Med.*, v.179, n.5, p.1683-87, 1994.

BECKER, R.B. *Dairy cattle breeds: origin and development*. University of Florida Press. 1973, p.227-85.

BELLAMY, R.; RUWENDE, C.; CORRAH, T.; MCADAM, K.P.; WHITTLE, H.C.; HILL, A.V. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N. Engl. J. Med.*, v.338, n.10, p.640-44, 1998.

BLACKWELL, J.M.; SEARLE, S.; MOHAMED, H.; WHITE, J.K. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. Review *Immunol. Lett.*, v.85, n.2, p.197-203, 2003.

BLACKWELL, J.M., SEARLE, S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (=Ity/Lsh/Bcg). *Immunol. Lett.*, v.65, n.1-2, 73-80, 1999.

BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G.; DE VOS, A.J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.*, v.77, n.7, p.461-64, 1999.

BOSCHIROLI, ML; OUAHRANI-BETTACHE, S; FOULONGNE, V; MICHAUX-CHARACHON, S; BOURG, G; ALLARDET-SERVENT, A; CAZEVIEILLE, C; LAVIGNE, JP; LIAUTARD, JP; RAMUZ, M; O'CALLAGHAN, D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.341-48, 2002.

BRACEWELL, C.D.; CORBEL, M.J. An association between arthritis and persistent serological reactions to *Brucella abortus* in cattle from apparently brucellosis-free herds. *Vet. Rec.*, v.106, p.99-101, 1980.

BRADLEY, D.J.; TAYLOR, B.A.; BLACKWELL, J.; EVANS, E.P.; FREEMAN, J. Regulation of Leishmania populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, v.37, p.7-14, 1979.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 6 de 8 de janeiro de 2004 Aprova o Regulamento

Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal.
Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> Acesso em 20/09/2005.

BRAVO, M. J.; COLMENERO, J. D., MARTÍN, J., ALONSO, A.; GONZÁLEZ, A. C.
Variation in the NRAMP1 gene does not affect susceptibility or protection in human brucellosis.
Microbes Infect., 2005 (no prelo).

BUSSMANN, V.; LANTIER, I.; PITEL, F.; PATRI, S.; NAU, F.; GROS, P.; ELSEN, J.M.;
LANTIER, F. cDNA cloning, structural organization, and expression of the sheep NRAMP1
gene. *Mamm Genome.*, v.9, n.12, p.1027-31, 1998.

CAMERON, H.S.; HUGHES, E.H.; GREGORY, P.W. Genetic resistance to brucellosis in
swine. *J. Anim. Sci.*, v.1, p.106-10, 1942.

CAMPBELL, G.A.; ADAMS, L.G. The long-term culture of bovine monocyte-derived
macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet.*
Immunol. Immunopathol., v.34, p.291-305, 1992.

CAMPERO, CM; LADDS, PW; 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.235-46, 1990

CARON, J.; MALO, D.; SCHUTTA, C.; TEMPLETON, J.W.; ADAMS, L.G. Genetic
susceptibility to infectious diseases linked to NRAMP1 gene in farm animals. In: CELLIER, M.;
GROS, P. *The Nramp family*, 2004, p.16-28.

CELLIER, M.; GOVONI, G.; VIDAL, S.; KWAN, T.; GROULX, N.; LIU, J.; SANCHEZ, F.;
SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P. Human natural resistance-associated macrophage
protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific
expression. *J. Exp. Med.*, v.180, n.5, p.1741-52, 1994.

CHRISTIE, T.E. Eradication of brucellosis in Northern Ireland: field problems and experience.
Vet. Rec., v.85, n.10, p.268-69, 1969.

CORNER, L.A; ALTON, G.G.; IYER, H. Distribution of *Brucella abortus* in infected cattle.
Aust. Vet. J., v.64, n.8, p. 241-44, 1987.

COSTA, C.N., BLAKE, R.W., POLLAK, E.J., OLTENACU, P.A., QUAAS, R.L., SEARLE,
S.R. Genetic analysis of Holstein cattle populations in Brazil and the United States. *J. Dairy*
Sci., v.83, n.12, p.2963-74, 2000.

COUSSENS, P.M.; COUSSENS, M.J.; TOOKER, B.C.; NOBIS, W. Structure of the bovine
natural resistance associated macrophage protein (NRAMP 1) gene and identification of a novel
polymorphism. *DNA Seq.*, v.15, p.15-25, 2004

DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Entry and intracellular localization of
Brucella spp. in vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet. Pathol.*, v.27, p.317-28,
1990a.

- 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.2320-28, 1990b.
- DUBANIEWICZ, A.; JAMIESON, S.E.; DUBANIEWICZ-WYBIERALSKA, M.; FAKIOLA, M.; NANCY MILLER, E.; BLACKWELL, J.M. Association between SLC11A1 (formerly NRAMP1) and the risk of sarcoidosis in Poland. *Eur. J. Hum. Genet.*, v.13, n.7, p.829-34, 2005.
- ENRIGHT, F.M.; SAMARTINO, L. Mechanisms of abortion in *Brucella abortus* infected cattle. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.*, Virginia, p.88-95, 1994.
- 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.424-30, 1984.
- ESTRADA-CHÁVEZ, C.; PEREIRA-SUÁREZ, A.L.; MERAZ, M.A.; ARRIAGA, C.; GARCIA-CARRANCÁ, A.; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, C.; MANCILLA, R. High-level expression of NRAMP1 in peripheral blood cells and tuberculous granulomas from *Mycobacterium bovis*-infected bovines. *Infect. Immun.*, v.69, n.11, p.7165-68, 2001.
- FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; SCHURR, E.; GROS, P.; ADAMS, L.G.; TEMPLETON, J.W. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Res.*, v.6, p.956-64, 1996.
- FICHT, TA. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.213-23, 2003.
- FORBES, J.R.; GROS, P. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood*. v.102, n.5, p.1884-92, 2003.
- FORBES, J.R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. Review. *Trends Microbiol.*, v.9, n.8, p.397-403, 2001.
- 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. KOSBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.135-45, 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, p.43-48, 2001.
- GOMES, M.S.; APPELBERG, R. Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology*. v.95, n.2, p.165-68, 1998.
- 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.331-32, 1986.

- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.281-97, 2002.
- GOSWAMI, T., BHATTACHARJEE, A., BABAL, P., SEARLE, S., MOORE, E., LI, M., BLACKWELL, J.M. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter. *Biochem. J.*, v.354, p.511-19, 2001.
- GREENWOOD, C.M.; FUJIWARA, T.M.; BOOTHROYD, L.J.; MILLER, M.A.; FRAPPIER, D.; FANNING, E.A.; SCHURR, E.; MORGAN, K. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am. J. Hum. Genet.*, v.67, n.2, p.405-16, 2000.
- GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J. Immunol.*, v.127, n.6, p. 2417-21, 1981.
- GRUENHEID, S., GROS, P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. Review. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.3, p.43-48, 2000.
- GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS, M.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.*, v.185, n.4, p.717-30, 1997.
- GUILLOTEAU, L.A.; DORNAND, J.; GROSS, A.; OLIVIER, M.; CORTADE, F.; VERN, Y.L.; KERBOEUF, D. Nramp1 is not a major determinant in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.*, v.71, n.2, p.621-8, 2003.
- HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; TEMPLETON, J.W.; SMITH, R. III. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows resistant to infection after inoculation of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.4, p.459-65, 1989.
- HO, M.; CHEERS, C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. *J. Infect. Dis.*, v.146, n.3, p.381-87, 1982.
- HOFMEISTER, A.; NEIBERGS, H.L.; POKORNY, R.M.; GALANDIUK, S. The natural resistance-associated macrophage protein gene is associated with Crohn's disease. *Surgery*, v.122, n.2, p. 173-79, 1997.
- HONG, C.B.; DONAHUE, J.M.; GILES, R.C. JR.; POONACHA, K.B.; TUTTLE, P.A.; CHEVILLE, N.F. HONG, C.B.; DONAHUE, J.M.; GILES, R.C. JR.; et al. *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet. Pathol.*, v.28, n.6, p.492-96, 1991.
- HORIN, P.; RYCHLÍK, I.; TEMPLETON, J.W.; ADAMS, L.G. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *Europ. J. Immunogenet.*, v.26, p.311-13, 1999.

HU, J.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P.; SEBASTIANI, G.; OLIEN, L.; MORGAN, K.; MALO, D. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. *Genome Res.*, v.7, n.7, p.693-704, 1997.

HU, J.; BUMSTEAD, N.; SKAMENE, E.; GROS, P.; MALO, D. Structural organization, sequence, and expression of the chicken NRAMP1 gene encoding the natural resistance-associated macrophage protein 1 *DNA Cell. Biol.*, v.15, n.2, p.113-23, 1996.

IBGE, Pesquisa da Pecuária Municipal 2003, Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatística/economia/agropecuária/censoagro> Acesso em:
10/10/2005

JABADO, B.N.; JANKOWSKI, A.; DOUGAPARSAD, S.; PICARD, V.; GRINSTEIN, S.; GROS, P. Natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.*, v.192, p.1237-47, 2000.

JIWA, S.F.H., KAZWALA, R.R., TUNGARAZA, R., KIMERA, S.I., KALAYE, W.J. Bovine brucellosis serum agglutination test prevalence and breed disposition according to prevalent management systems in the lake Victoria zone of Tanzania. *Prev. Vet. Med.*, v. 26, p.341-46, 1996.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. *Pathology of Domestic Animals*, 4ed., San Diego: Academic Press, 1993, p.396-401 e 500-03.

KELLAR, J., MARRA, R., MARTIN, W. Brucellosis in Ontario: a case control study. *Can. J. Comp. Med.*, v.40, n.2, p.119-28, 1976.

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, p.65-78, 2003.

KUHN, D.E.; BAKER, B.D.; LAFUSE, W.P.; ZWILLING, B.S. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. *J. Leukoc. Biol.*, v.66, p.113-19, 1999.

LAMBERT, G; MANTHEI, CA; DEYOE, BL. Studies on *Brucella abortus* infection in bulls. *Am. J. Vet. Res.*, v.24, n.103, p. 1153-57, 1963.

LISSNER, C.R.; SWANSON, R.N.; O'BRIEN, A.D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the Ity gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J. Immunol.*, v.131, n.6, p.3006-13, 1983.

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.275-77, 1984.

LUNA, G. L. *Manual of histologic staining methods of the armed Forces Institute of Pathology*. 3ªed, McGraw-Hill Book Company, 1968, 258p.

LUNA-MARTINEZ, J.E., MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.19-30, 2002.

MAC FADDIN, J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Bueno Aires, Panamericana, 1980, 301p.

MALO, D.; VOGAN, K.; VIDAL, S.; HU, J.; CELLIER, M.; SCHURR, E.; FUKS, A.; BUMSTEAD, N.; MORGAN, K.; GROS, P. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics*, v.23, p.51-61, 1994.

MATHEI, C.A.; CARTER, R.W. Persistence of *Brucella abortus* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.11, p.172-81, 1950.

MATIASOVIC, J.; KUBICKOVA, S.; MUSILOVA, P.; RUBES, J.; HORIN, P. Characterization of the NRAMP1 (SLC11A1) gene in the horse (*Equus caballus*). *Eur. J. Immunogenet.*, v.29, n.5, p.423-29, 2002.

McCAUGHEY, W.J.; PURCELL, D.A. Brucellosis in bull. *Vet. Rec.*, v. 93, p.336-37, 1973.

MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.*, v.26, p.513-15, 1989.

MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Vet. Pathol.*, v.26, n.5, p.357-68, 1989.

MEADOR, V.P.; HAGEMOSER, W.A.; DEYOE, B.L. Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, n.2, p.274-80, 1988.

MORENO, E. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.31-38, 2002.

MURAI, T.; YAMAUCHI S. Erythrophagocytosis by the trophoblast in a bovine placenta. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.48, p.75-88, 1986.

MUSA, M.T.; JAHANS, K.L.; FADALLA, M.E. Clinical manifestations of brucellosis in cattle of the southern Darfur Province, western Sudan. *J. Comp. Pathol.*, v.103, p.95-99, 1990.

NAESSENS, J.; TEALE, A.J.; SILEGHEM, M. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. Review. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.87, n.3-4, p.187-94, 2002.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.24, p.69-95, 1980.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.447-59, 2002.

- NORTH, R. J.; MEDINA, E. How important is Nramp1 in tuberculosis? Review. *Trends Microbiol.*, v.6, n.11, 1998.
- 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.417-24, 2002.
- OMER, M.K., SKJERVE, E., WOLDEHIWET, Z., HOLSTAD, G. Risk factors for *Brucella* spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea. *Prev. Vet. Med.*, v.46, n.4, p.257-65, 2000.
- ORITA, M.; IWAHANA, H. KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T.. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p.2766-60, 1989.
- PARKER, R.J., SHEPHERD, R.K., TRUEMAN, K.F., JONES, G.W., KENT, A.S., POLKINGHORNE, I.G., Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. *Vet. Parasitol.*, v.17, n.3, p.205-13, 1985.
- PAYNE, J.M. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *J. Pathol. Bacteriol.*, v.78, p.447-63, 1959.
- PENA, M.T.; MILLER, J.E.; WYATT, W.; KEARNEY, M.T. Differences in susceptibility to gastrointestinal nematode infection between Angus and Brangus cattle in south Louisiana. *Vet. Parasitol.*, v.8, n.1-2, p.51-61, 2000.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters Appl. Microbiol.*, v.8, p.151-56, 1989.
- 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.5711-24, 1998.
- 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, p13-29, 2005.
- PRICE, R.E.; TEMPLETON, J.W.; SMITH, R. III; ADAMS, L.G. Ability of phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.58, n.4, p.879-86, 1990.
- QURESHI, T.; TEMPLETON, J.W.; ADAMS, L.G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella* Dublin and *Salmonella typhimurium* in macrophages

from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.50, p.55-65, 1996.

RANKIN, J.E.F. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. *Vet. Rec.*, v.77, p.132-35, 1965.

RECHAV, Y.; KOSTRZEWSKI, M.W. Relative resistance of six cattle breeds to the tick *Boophilus decoloratus* in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.58, n.3, p.181-86, 1991.

SALMAN, M.D., MEYER, M.E. Epidemiology of bovine brucellosis in the Mexicali Valley, Mexico: literature review of disease-associated factors. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, n.8, p.1557-60, 1984.

SAMARTINO, L.E. Brucellosis in Argentina. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.71-80, 2002.

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.; 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.; TRAU, R.E.; ENRIGHT, F.M. Invasion and replication of *Brucella abortus* in three different trophoblastic cell lines. *Zentralbl. Veterinarmed B*, v.41, n.4, p.229-36, 1994.

SANTIAGO, A. A. *O gado Nelore*. Secretaria da Agricultura, 1972, 554p.

SANTIAGO, A. A. *Os cruzamentos na pecuária bovina*. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987, 549p.

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-peroxidase en el testículo y en el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Archivos de Reproducción Animal*, n.6, p.34-41, 1998.

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.

SATHIYASEELAN, J.; JIANG, X.; BALDWIN, C.L. Growth of *Brucella abortus* in macrophages from resistant and susceptible mouse strains. *Clin. Exp. Immunol.*, v.121, n.2, p.289-94, 2000.

SAURET, J.M.; VILISSOVA, N. Human brucellosis. Review. *J. Am. Board. Fam. Pract.*, v.15, n.5, p.401-6, 2002.

SEARLE, S.; BRIGHT, N.A.; ROACH, T.I.; ATKINSON, P.G.; BARTON, C.H.; MELOEN, R.H.; BLACKWELL, J.M. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *J. Cell. Sci.*, v.111, p.2855-66, 1998.

SHAW, M.A.; CLAYTON, D., ATKINSON, S.E., WILLIAMS, H.; MILLER, N.; SIBTHORPE, D.; BLACKWELL, J.M. Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. *J Med Genet.* v.33, n.8, p.672-77, 1996.

SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; BORGES, A.M.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.1-12, 2005.

SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P. Infection genomics: *Nramp1* as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu. Rev. Med.*, v.49, p.275-87, 1998.

SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S.C.; CAREY, M.; MILLER, C.; KO, J.; COVERT, J. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.54, p.309-19, 1996.

SPOONER, R.L.; BRADLEY, J.S.; YOUNG, G. B. Genetics and disease in domestic animals with particular reference to dairy cattle. *Vet. Rec.*, v.16, p.125-29, 1975.

TAKAHASHI, K.; SATOH, J.; KOJIMA, Y.; NEGORO, K.; HIRAI, M.; HINOKIO, Y.; KINOCHI, Y.; SUZUKI, S.; MATSUURA, N.; SHIMOSEGAWA, T.; OKA, Y. Promoter polymorphism of SLC11a1 (formally NRAMP1) confers susceptibility to autoimmune type 1 diabetes mellitus in Japanese. *Tissue antigens*, v. 63, p.231-36, 2004.

TEMPLETON, J.W.; SMITH, R. III; ADAMS, L.G. Natural disease resistance in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.192, n.9, p.1306-15, 1988.

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.

TUGGLE, C.K., SCHMITZ, C.B., GINGERICH-FEIL, D. Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.277, 1997.

VIDAL, S.M., PINNER, E., LEPAGE, P., GAUTHIER, S., GROS, P. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J. Immunol.*, v.157, n.8, p.3559-68, 1996.

VIDAL, S.M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, v.73, n.3, p.469-85, 1993.

VIDAL, S.M.; TREMBLAY, M.L.; GOVONI, G. GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural

resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.*, v.182, n.3, p.655-66, 1995.

WAMBURA, P.N.; GWAKISA, P.S.; SILAYO, R.S.; RUGAIMUKAMU, E.A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. *Vet. Parasitol.*, v.77, p.63-70, 1998.

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.

WOMACK, J. E. Molecular cytogenetics of cattle: a genomic approach to disease resistance and productivity. *J. Dairy Sci.*, v.71, n.4, p. 1116-23, 1988.

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

WYLLIE, S.; SEU, P.; GOSS, J A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and iron metabolism in macrophages. *Microbes Infect.*, v.4, p.351-59, 2002.

WYN-JONES, G.; BAKER, J.R.; JOHNSON, P.M. A clinical and immunopathological study of *Brucella abortus* strain 19-induced arthritis in cattle. *Vet. Rec.*, v.107, p.5-9, 1980.

YEN, J.H.; LIN, C.H.; TSAI W.C.; OU, T.T.; WU, C.C.; HU, C.J.; LIU, H.W. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.*, 2005 (no prelo).

ZHANG, W.; SHAO, L.; WENG, X.; HU, Z.; JIN, A.; CHEN, S.; PANG, M.; CHEN, Z.W. Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (*NRAMP1*) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.40, n.9, p.1232-36, 2005.

ZWILLING, B.S.; KUHN, D.E.; WIKOFF, L.; BROWN, D.; LAFUSE, W. Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth, *Infect. Immun.* v.67, p.1386-92, 1999.

ANEXOS

**Anexo 1. Ocorrência de parto ou aborto nos grupos experimentais do
Capítulo 3**

Animal	Grupo	Gestação	Diferença A/P*	Aborto/Parto
2	B19	267	-12	P
3	B19	270	-11	P FRACO**
5	B19	282	1	P
13	B19	290	12	P
17	B19	283	5	P
34	B19	300	21	P
46	B19	255	-24	P FRACO
58	B19	291	11	P
62	B19	265	-14	P
63	B19	251	-29	A
68	B19	279	0	P
73	B19	228	-52	A
104	B19	267	-12	P
105	B19	285	7	P
109	B19	282	4	P
117	B19	252	-27	P FRACO
118	B19	235	-44	A
10	RB51	277	-3	P
14	RB51	296	18	P
16	RB51	235	-44	A
24	RB51	250	-28	A
31	RB51	290	12	P
55	RB51	240	-39	A
74	RB51	252	-27	A
75	RB51	294	13	P
86	RB51	274	-5	P
92	RB51	281	2	P
97	RB51	277	-4	P
101	RB51	288	10	P
18	NV	312	32	P
38	NV	256	-23	A
56	NV	252	-27	P FRACO
78	NV	254	-25	P FRACO
82	NV	264	-15	P FRACO
83	NV	269	-10	P
84	NV	252	-27	A
85	NV	297	19	P
87	NV	262	-17	A
90	NV	238	-42	A
94	NV	270	-9	P
98	NV	276	-3	P
108	NV	251	-29	A

* Diferença entre a data esperada para parto e a data do parto ou aborto.

** P FRACO: nascimento de bezerro prematuro e fraco.

Anexo 2. Genotipagem e sorologia das vacas utilizadas no Capítulo 4

Animal	Amostra DNA	nº identificação	PCR	Sorologia
1	210	422	175	positivo
2	212	85	175	negativo
3	213	221-9	175	negativo
4	214	055v	175	positivo
5	215	063a	175	positivo
6	216	049v	heterozigoto	positivo
7	217	053v	175	positivo
8	218	051v	175	positivo
9	219	81v	175	positivo
10	220	192v	175	positivo
11	221	194a	175	negativo
12	222	1019v	175	positivo
13	223	253v	175	positivo
14	224	748v	heterozigoto	positivo
15	225	10v	175	positivo
16	226	407v	heterozigoto	positivo
17	227	61	175	positivo
18	228	18	175	negativo
19	229	815v	heterozigoto	positivo
20	230	1262	heterozigoto	negativo
21	231	046v	177	positivo
22	232	0183-9	175	negativo
23	233	1257	175	negativo
24	234	103	175	negativo
25	235	07/07/99	175	positivo
26	236	1804	175	negativo
27	237	189a	175	negativo
28	238	26	175	positivo
29	239	551	175	positivo
30	240	1247v	175	positivo
31	241	052v	175	positivo
32	242	1802	175	positivo
33	243	1801	175	positivo
34	244	1021	175	negativo
35	245	1055v	175	positivo
36	246	1014a	heterozigoto	negativo
37	247	22ia	175	negativo
38	248	132a	175	negativo

Animal	Amostra DNA	nº identificação	PCR	Sorologia
39	249	1733a	175	positivo
40	250	137v	heterozigoto	positivo
41	251	1805	heterozigoto	negativo
42	252	1806	175	negativo
43	253	286a	175	negativo
44	254	172a	heterozigoto	negativo
45	255	111a	175	positivo
46	256	416	heterozigoto	negativo
47	257	060a	175	negativo
48	258	40v	175	positivo
49	259	45	175	negativo
50	261	1304v	175	positivo
51	262	174	175	positivo
52	263	193v	175	positivo
53	264	1703v	175	positivo
54	265	415v	175	positivo
55	266	04v	175	positivo
56	267	204v	175	positivo
57	268	1046v	175	positivo
58	270	002v	175	positivo
59	271	367a	175	negativo
60	272	160v	175	positivo
61	273	127v	175	positivo
62	274	162v	175	positivo
63	275	048v	175	positivo
64	276	6014	175	negativo
65	277	050v	heterozigoto	positivo
66	278	1270v	175	positivo
67	279	521v	heterozigoto	positivo
68	280	79v	175	positivo
69	281	1272v	175	positivo
70	282	221v	175	positivo
71	283	503a	175	negativo
72	284	168v	175	positivo
73	285	135	175	negativo
74	286	431a	175	negativo
75	287	157v	175	positivo
76	288	6004v	175	positivo
77	289	227v	175	positivo
78	290	811v	175	positivo

nimal	Amostra DNA	nº identificação	PCR	Sorologia
79	291	102	175	negativo
80	294	225v	175	positivo
81	295	642v	175	positivo
82	296	1056v	175	negativo
83	297	1509a	175	negativo
84	299	783a	175	negativo
85	300	798v	heterozigoto	positivo
86	301	36	175	negativo
87	302	0032v	heterozigoto	positivo
88	303	199v	175	positivo
89	304	340v	175	positivo
90	305	41	175	negativo
91	306	78v	175	positivo
92	307	24v	175	positivo
93	309	593	175	negativo
94	311	29v	175	positivo
95	312	155v	175	positivo
96	313	6015v	175	negativo
97	314	43	175	negativo
98	315	1246a	175	negativo
99	316	768v	175	positivo
100	317	78neg	175	positivo