

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Programa de Pós-Graduação em Imunologia, DIP/ Genética e Biotecnologia

Marina Coelho de Queiroz

**Efeito do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a bactéria
Brucella abortus.**

Juiz de fora- MG

2013

MARINA COELHO DE QUEIROZ

**Efeito do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a bactéria
Brucella abortus.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do Título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Doutor Gilson C. Macedo.

Juiz de Fora
2013

Marina Coelho de Queiroz

**Efeito do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a bactéria
*Brucella abortus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção ao Título de Mestre em Imunologia.

Aprovada em de de

Banca Examinadora:

Examinador UFJF

Examinador UFJF

Orientador: Prof. Doutor Gilson Costa Macedo

Juiz de Fora - MG

2013

RESUMO

A Brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella* que causa em seres humanos febre ondulante, endocardite, artrite e osteomielite e em animais causa aborto e infertilidade. Destaca-se na resposta imune contra a *Brucella* a produção de IFN- γ e a atividade de linfócitos T CD8⁺, destruindo o patógeno ou deixando-o vulnerável aos mecanismos extracelulares da imunidade.

A Talidomida (Td) é um fármaco capaz de induzir a formação de um perfil T_H1, com elevada produção de IFN- γ , além de co-estimular e induzir a proliferação e produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a *B. abortus*, focando no futuro desenvolvimento de novos fármacos ou componentes vacinais que auxiliem no combate a esta importante patologia.

Foram avaliadas a forma de tratamento e a concentração de Talidomida capaz de influenciar a carga bacteriana presente no baço de animais C57BL/6 infectados; O número de bactérias no baço de animais tratados, após 1,3 e 6 semanas de infecção; A produção de IFN- γ e óxido nítrico em esplenócitos derivados destes animais; A produção de citocinas (IL-12, IFN- γ e TNF- α) no tecido hepático; O percentual de células T CD4⁺ ou CD8⁺ presentes no baço de animais tratados e infectados e o potencial citotóxico de esplenócitos derivados destes animais.

Foi verificado que o tratamento prévio com Td reduziu a carga bacteriana em todas as semanas avaliadas, conforme evidenciado pela cinética. A produção de IFN- γ e óxido nítrico foram maiores em esplenócitos derivados de animais tratados com Td. A produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α foi elevada no tecido hepático após o tratamento. E nos esplenócitos foi observado maior percentual de células T CD8⁺ e maior citotoxicidade. Assim, os resultados encontrados até o momento nos levam a sugerir que o tratamento com Talidomida potencializam a eliminação do patógeno.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis caused by bacteria from the genus *Brucella* which causes undulant fever, endocarditis, arthritis and osteomyelitis in humans and, in animals, it causes abortion and infertility. The production of IFN- γ and the activity of T CD8⁺ lymphocytes have an important role in the immune response against *Brucella* destroying the pathogen or leaving it vulnerable to extracellular immunity mechanisms.

Thalidomide (Td) is a drug which is able to induce the formation of a T_H1 profile, with high production of IFN- γ , and it also coestimulates and induces proliferation and production of cytokines by T CD8⁺ lymphocytes. The purpose of this study was to evaluate the influence of the treatment with Thalidomide on the immune response against *B. abortus*, focusing in the development of new drugs or vaccine components in the future which will help in the fight against this important pathology.

The form of treatment and Thalidomide concentration capable of influencing the bacterial load in the spleen of C57BL/6 infected animals were evaluated; the number of bacteria in the spleen of treated animals after 1, 3 and 6 weeks of infection; the production of IFN- γ and nitric oxide in splenocytes from these animals; the (IL-12, IFN- γ e TNF- α) cytokine production in the liver tissue; the percentage of T CD4⁺ or CD8⁺ cells in the spleen of treated and infected animals and the cytotoxic potential of splenocytes from these animals.

In this study it was verified that previous treatment with Td reduced the bacterial load in all the evaluated weeks, as it was evidenced by kinetics. The production of IFN- γ and nitric oxide was higher in splenocytes from animals treated with Td. The production of IL-12, IFN- γ and TNF- α was high in the liver tissue after treatment. And a higher percentage of T CD8⁺ cells and higher cytotoxicity were observed in splenocytes. The results so far suggest that treatment with Thalidomide potentializes the elimination of the pathogen.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>A Brucella</i> e a Brucelose.....	12
1.1.1 Histórico.....	12
1.1.2 Caracterização da bactéria.....	13
1.1.3 Epidemiologia.....	17
1.1.4 Patogênese.....	19
1.1.4.1 Patogênese no Homem.....	20
1.1.4.2 Patogênese no Animal.....	22
1.1.5 Diagnóstico, Tratamento e Prevenção.....	23
1.2 A resposta imune contra a bactéria.....	25
1.2.1 Imunidade inata.....	26
1.2.2 Imunidade adaptativa.....	28
1.3 A Talidomida.....	31
1.3.1 Histórico.....	31
1.3.2 Mecanismo de Ação.....	32
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVO	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.1 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Animais.....	38
4.2 Cepas bacterianas.....	38
4.3 Condições de cultivo bacteriano.....	38
4.4 Tratamento dos animais.....	39
4.5 Infecção.....	39
4.6 Carga bacteriana.....	39
4.7 Avaliação do curso da Brucelose murina em animais tratados com Tali- domida.....	39

4.8	Cultura de esplenócitos.....	40
4.9	Determinação da concentração de citocinas no tecido hepático.....	40
4.10	Dosagem de citocinas.....	41
4.11	Dosagem de óxido nítrico.....	41
4.12	Análise de Citotoxicidade.....	41
4.13	Contagem diferencial de células do baço.....	42
4.14	Análise do percentual das células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ por citometria de fluxo.....	42
4.15	Análises estatísticas.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Talidomida diminui a carga bacteriana no baço em animais tratados e infectados com <i>B. abortus</i>	45
5.2	Tratamento por 7 dias reduz a carga bacteriana no baço de animais tratados e infectados.....	47
5.3	Talidomida reduz a carga bacteriana do baço em todos os tempos de tratamento em animais tratados e infectados por <i>B. abortus</i>	48
5.4	Talidomida aumenta a produção de IFN- γ em esplenócitos estimulados com <i>B. abortus</i>	49
5.5	Talidomida aumenta a produção de Óxido Nítrico em resposta a <i>Brucella</i>	50
5.6	Talidomida aumenta a concentração de citocinas no tecido hepático.....	51
5.7	Talidomida aumenta o número de linfócitos e diminui o número de neutrófilos e monócitos no baço de animais tratados e infectados por <i>B. abortus</i>	53
5.8	Talidomida aumenta o percentual das células CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ em animais tratados e infectados por <i>B. abortus</i>	55
5.9	Talidomida aumenta a atividade citotóxica induzida por <i>B. abortus</i>	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto das colônias de *B. abortus*, cepa S2308, após 3 dias de crescimento em meio *Brucella* Broth (DIFCO), solidificado em Agar. Fonte: Laboratório de Imunologia de doenças infecto-parasitárias e obesidade.

Figura 2: Principais fontes de infecção por *Brucella* em humanos.

Figura 3: Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo da *Brucella* spp.

Figura 4: Incidência mundial da Brucelose humana.

Figura 5: Estrutura da Talidomida.

Figura 6: Talidomida diminui a carga bacteriana no baço em animais tratados e infectados com *B. abortus*.

Figura 7: Talidomida diminui a carga bacteriana no baço em animais tratados e infectados com *B. abortus*.

Figura 8: Tratamento por 7 dias reduz a carga bacteriana no baço de animais tratados e infectados.

Figura 9: Talidomida reduz a carga bacteriana do baço em todos os tempos de tratamento em animais tratados e infectados por *B. abortus*.

Figura 10: Talidomida aumenta a produção de IFN- γ em esplenócitos estimulados com *B. abortus*.

Figura 11: Talidomida aumenta a produção de Óxido Nítrico em resposta a *Brucella*.

Figura 12: Talidomida aumenta a concentração de citocinas no tecido hepático.

Figura 13: Talidomida aumenta o número de linfócitos e diminui o número de neutrófilos e monócitos no baço de animais tratados e infectados por *B. abortus*.

Figura 14: Talidomida aumenta o percentual das células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em animais tratados e infectados por *B. abortus*.

Figura 15: Talidomida aumenta a atividade citotóxica induzida por *B. abortus*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – célula apresentadora de antígeno

BB - meio de cultura *Brucella* Broth

BCV – *Brucella* containing vacúolo

DMSO: dimetil sulfóxido

ELISA- ensaio de absorção imunoenzimático

FACS – do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorting*

IL-12- interleucina 12

IL-2- interleucina 2

IL-10- interleucina 10

IL-1 β - interleucina 1 beta

IL-6- interleucina 6

IFN- γ interferon gama

IL – interleucina

LPS – lipopolissacarídeo

mg – miligramas

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

mL – mililitro

MyD88 – fator de diferenciação mielóide 88

NK – do inglês *natural killer*

NO – óxido nítrico

PAMP – padrão molecular associado à patógeno

PBS – tampão salina fosfato

Td- talidomida

TLR – Receptor do tipo Toll

TNF- α fator de necrose tumoral alfa

Th1 – T *helper* 1

UFC – unidade formadora de colônia

μg - micrograma

μL – microlitro

1. INTRODUÇÃO

1.1 A *Brucella* e a Brucelose

1.1.1 Histórico

A Brucelose é uma doença antiga que pode ser rastreada por volta do ano 1.600 antes de Cristo (AC) no Egito. Análises de ossos egípcios antigos, datando de cerca de 750 AC, já apresentaram evidências de sacroileíte e outras lesões osteoarticulares, complicações comuns da Brucelose (PAPPAS; PAPADIMITRIOU, 2007).

David Bruce conseguiu isolar uma bactéria (hoje conhecida como *Brucella melitensis*) em 1887 do baço de um soldado britânico que morreu de doença febril (febre de Malta) comum entre os militares estacionados em Malta, um arquipélago situado no centro do Mediterrâneo. Por quase 20 anos após o isolamento da *B. melitensis*, a febre de Malta permaneceu um mistério e foi descrita como uma doença transmitida por vetores (SRIRANGANATHAN et al., 2009; WYATT, 2005).

Em 1897, L.F. Benhard Bang isolou e identificou uma bactéria intracelular em vacas que abortaram, denominando-a *Bacillus abortus bovis*. Os sintomas foram reproduzidos em novilhas gestantes infectadas experimentalmente e a doença foi chamada de “doença de Bang”. Porém, não havia sido estabelecida qualquer relação entre essa doença e a Febre de Malta (PACHECO; MELLO, 1956).

Em 1.905, Themistocles Zammit acidentalmente demonstrou a natureza zoonótica da doença por isolar a *B. melitensis* do leite de cabra. Acreditava-se que as cabras não fossem a fonte de infecção, uma vez que elas não ficavam doentes quando inoculadas com culturas do microorganismo. Entretanto, a descoberta de que cabras saudáveis poderiam ser portadoras da doença foi um grande avanço no estudo epidemiológico dessa doença (SRIRANGANATHAN et al., 2009; WYATT, 2005).

Alice Evans, uma cientista americana, executou um trabalho de referência sobre bactérias patogênicas em produtos lácteos que finalmente confirmou a relação entre a doença de Bang e a Febre de Malta, e renomeou o gênero como *Bru-*

cella. Seu trabalho foi central na conquista da aceitação do processo de pasteurização para prevenir a Brucelose humana nos Estados Unidos (SRIRANGANATHAN et al., 2009).

A descoberta da *Brucella abortus* em mamíferos marinhos no início de 1990 mudou o conceito da distribuição da Brucelose, assim como a maior necessidade de medidas de controle da patologia (SRIRANGANATHAN et al., 2009).

1.1.2 Caracterização da bactéria

O agente etiológico da Brucelose é a bactéria *Brucella* spp, um pequeno cobicilo, Gram-negativo, não capsulado, parasita intracelular facultativo, sem capacidade de locomoção e de formar esporos (PESSEGUEIRO et al., 2003). Embora descrita como imóvel, a *Brucella* spp. possui todos os genes necessários para a montagem de um flagelo funcional (FRETIN et al., 2005).

As bactérias do gênero *Brucella*, possuem crescimento aeróbio, porém algumas espécies requerem uma atmosfera com adição de 5 a 10% de CO₂. Crescem bem a 37°C, em meios ricos, com pH entre 6,6 e 7,4. As colônias de *Brucella* tornam-se visíveis em meio sólido em dois ou três dias (**Figura 1**), podendo apresentar-se sob a forma lisa ou rugosa, dependendo da cepa (ALTON et al., 1998).

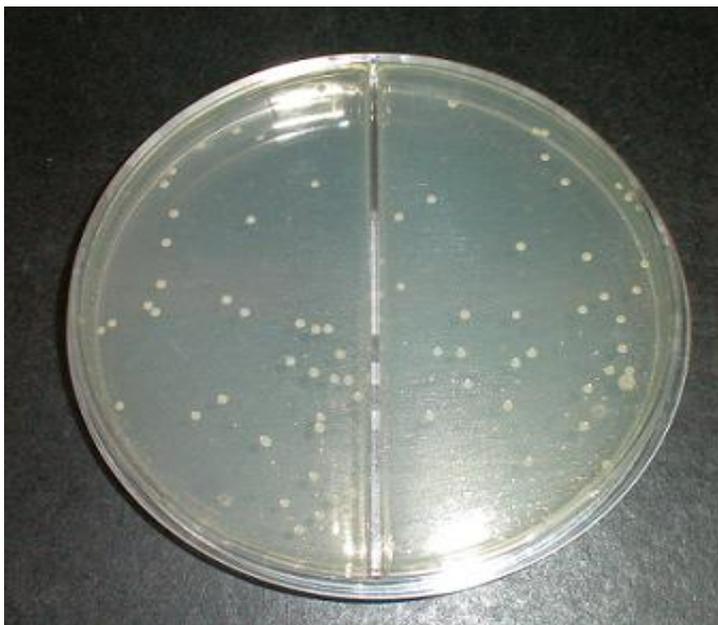


Figura 1: Aspecto das colônias de *B. abortus*, cepa S2308, após 3 dias de crescimento em meio *Brucella* Broth (DIFCO), solidificado em Agar. Fonte: Laboratório de Imunologia de doenças infecto-parasitárias e obesidade (LIDIPO)/UFJF.

O gênero *Brucella* pertence filogeneticamente à família α -Proteobacteria, um grupo que contém diversas espécies bacterianas, incluindo simbioses de animais e plantas (*Wolbachia*, *Sinorhizobium*), assim como patógenos intracelulares facultativos ou obrigatórios e patógenos extracelulares como *Rickettsia* e *Agrobacterium* (TSOLIS, 2002).

Nove espécies de *Brucella* são reconhecidas atualmente, sete das quais podem afetar animais terrestres: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* e *B. microti*. Essas espécies infectam, respectivamente, o gado, cabras, suínos, ovinos, cães, ratos do deserto e ratazanas comuns (SCHOLZ et al., 2008; VERGER et al., 1987). Há também outras duas espécies que infectam mamíferos marinhos, *B. ceti* e *B. pinnipedialis* (FOSTER et al., 2007).

As três primeiras espécies, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, são denominadas *Brucella* clássicas e dentro dessas espécies sete subtipos são reconhecidos por *B. abortus*, três por *B. melitenses* e cinco por *B. suis*. As espécies remanescentes não são diferenciadas em subtipos. As linhagens de *Brucella* foram denomina-

das baseadas na preferência do patógeno pelo hospedeiro animal (VERGER et al., 1987).

Dentre as nove espécies, três merecem especial atenção por apresentam risco de infecção para humanos: *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus*. Apesar da *B. melitensis* ser a mais patogênica, *B. abortus* é a principal fonte de infecção, por ser a espécie mais difundida no mundo (CORBEL, 1997). A *Brucella canis* também pode infectar o homem, contudo sua incidência é relativamente baixa (CARMI-CHAEI, 1990) (Figura 2).

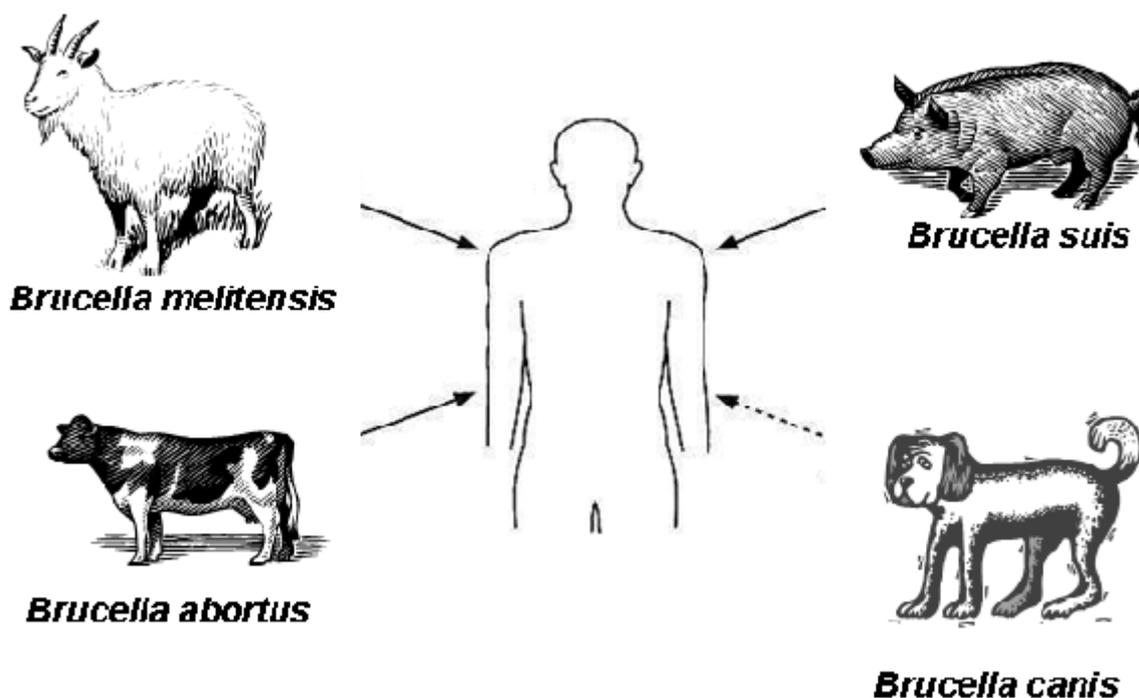


Figura 2:- Principais fontes de infecção por *Brucella* em homens e animais.

O genoma dos membros do gênero *Brucella* são muito semelhantes em tamanho e composição genética. Atualmente, dez sequências do genoma que representam cinco espécies de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ovis*, e *B. canis*) estão disponíveis enquanto outras 25 linhagens de *Brucella* adicionais estão sendo sequenciadas (SRIRANGANATHAN et al., 2009).

Cada espécie dentro do gênero possui o tamanho do genoma de cerca de 3.29 Mb e consiste de dois cromossomos circulares. O cromossomo I é de aproxi-

madamente 2.11 Mb e o cromossomo II de aproximadamente 1,18 Mb. O conteúdo de G + C de todos os genomas de *Brucella* é de 57,2% para o cromossomo I e de 57,3% para o cromossomo II (DELVECCHIO et al., 2002; HALLING et al., 2005; PAULSEN et al., 2002).

A *Brucella* é uma bactéria Gram-negativa cuja célula é composta por duas membranas. A membrana externa é o primeiro ponto de interação entre a bactéria e o hospedeiro e apresenta um papel crucial durante o processo infeccioso. A camada exterior da membrana externa é composta de LPS (lipopolissacarídeo), o qual consiste de três componentes chaves: o lipídeo A, moléculas de açúcar e o antígeno O (**Figura 3**)(CARDOSO et al., 2006).

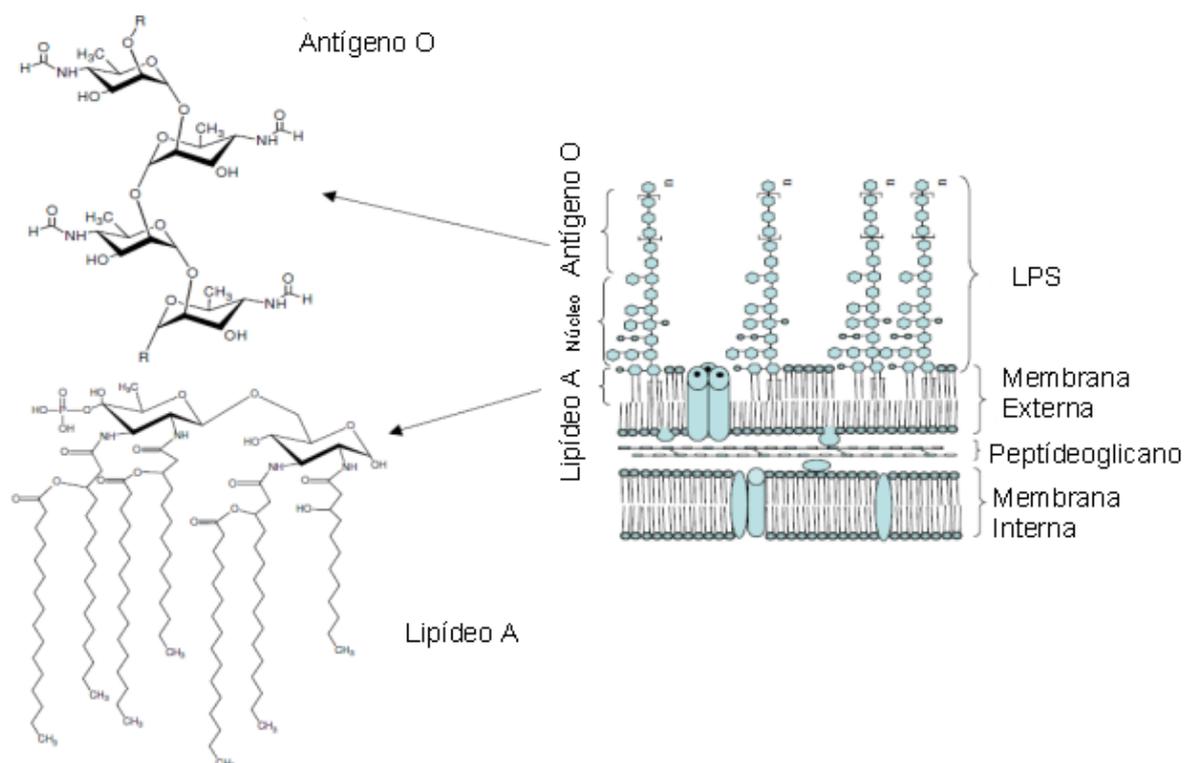


Figura 3: Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo da *Brucella* spp. (CARDOSO et al., 2006).

A *Brucella* ocorre naturalmente como linhagens de LPS lisas (S-LPS), que são linhagens que possuem o LPS com o antígeno O completo. Já as linhagens de

LPS rugoso não possuem o antígeno O completo em sua constituição (CARDOSO et al., 2006).

A capacidade da *Brucella* de produzir o S-LPS com o antígeno O completo é crucial para sua virulência em humanos. *B.melitensis*, *B. suis*, e *B. abortus* que apresentam o antígeno O completo, são as principais espécies responsáveis pelas infecções humanas. Espécies de *Brucella* ou mutantes que não possuem o antígeno O do LPS, tais como a *B.canis* e a *B. ovis*, são consideradas menos virulentas ou são avirulentas em humanos (YOUNG, 1995).

1.1.3 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Brucelose humana é considerada a zoonose bacteriana mais prevalente no mundo (**Figura 4**), com mais de 500.000 novos casos relatados por ano. Esta enfermidade é encontrada principalmente em países do Mediterrâneo, Ásia Central, Península Arábica, Índia e América Latina, o que a caracteriza amplamente difundida (HARTIGAN, 1997). Entretanto, apesar de sua grande presença nos locais citados, a distribuição geográfica da Brucelose é constantemente modificada, com novos focos de emergência e re-emergência. Além disso, a epidemiologia da Brucelose humana tem mudado drasticamente ao longo dos últimos anos devido a várias razões socioeconômicas e políticas, aliadas ao aumento do tráfego internacional (PAPPAS et al., 2006b).

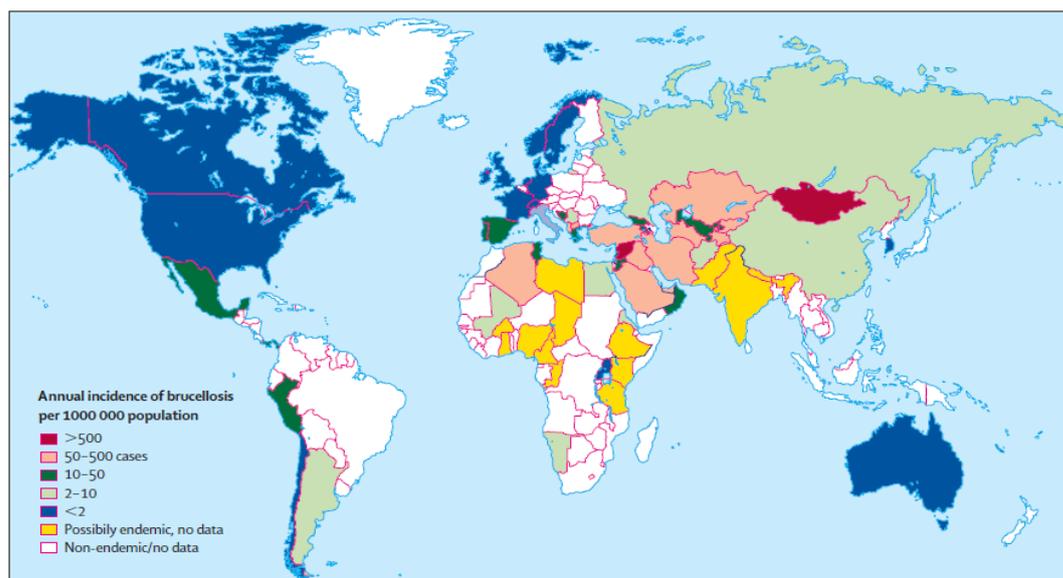


Figura 4: Incidência mundial da Brucelose humana (Pappas et al., 2006)

Na América do Norte, Austrália e no Norte Europeu, o controle desse patógeno nos reservatórios animais através da vacinação e do abate dos animais infectados, tem reduzido fortemente a incidência da Brucelose humana nessas regiões (PAPPAS et al., 2006).

Na América Central, a prevalência da Brucelose bovina tem sido estimada entre 4 e 8% e programas baseados em vacinação pouco têm contribuído para o avanço no controle da enfermidade (MORENO, 2002). O México, endêmico para a Brucelose, começou a combatê-la em 1942 mas, apesar de alguns avanços obtidos ao longo dos anos, a situação ainda está longe de ser a ideal. Além do mais, nesse país existe a presença da *B. melitensis*, espécie mais patogênica para o homem (MARTINEZ; TERAN, 2002).

No Paraguai, testes sorológicos realizados em 1,2 milhões de amostras, no período de 20 anos (1979-2000), indicaram que a quantidade de animais reagentes permaneceu constante entre 3 e 4% (BAUMGARTEN, 2002). Na Argentina, diversos estudos têm demonstrado que a Brucelose está presente na maioria das espécies domésticas. Estima-se que a prevalência da Brucelose bovina seja de 10 a 13% e que 4 a 5% dos animais estejam infectados, o que resulta em uma perda anual próxima de 60 milhões de dólares (SAMARTINO, 2002).

No Brasil, a Brucelose foi detectada pela primeira vez em 1913. Atualmente, a Brucelose bovina, causada pela bactéria *Brucella abortus*, é a infecção mais prevalente, causando um impacto econômico estimado de 32 milhões de dólares anuais (BRAZIL, 1971), uma vez que afeta ruminantes que são essenciais para a economia, impedindo o comércio e a importação (ARIZA, 1999).

Estudos mostram que a Brucelose bovina parece estar disseminada por todo o território brasileiro, com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Em 1975, foram verificadas as seguintes prevalências em animais, por regiões: Sul, 4%; Sudeste, 7,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Nordeste, 2,5% e Norte, 4,1% (BRASIL, 1977).

Posteriormente, alguns Estados realizaram estudos sorológicos por amostragem, os quais não evidenciaram grandes alterações em relação aos índices nacionais verificados em 1975. No Rio Grande do Sul, a prevalência decresceu de 2%, em 1975, para 0,3%, em 1986. Em Santa Catarina, passou de 0,2%, em 1975, para 0,6%, em 1996. No Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3%, semelhante à de 1975 no antigo Estado do Mato Grosso. Em Minas Gerais, passou de 7,6%, em 1975, para 6,7%, em 1980. No Paraná, a prevalência estimada em 1975 foi de 9,6%, passando para 4,6% em 1989 (BRASIL, 2006).

1.1.4 Patogênese

A origem das diversas manifestações clínicas da Brucelose em humanos e animais ainda não foram claramente definidas. Entretanto, não há dúvida que o aumento da replicação do patógeno no hospedeiro está relacionado ao surgimento dos sintomas (KO; SPLITTER, 2003). Assim, a patogênese causada pela infecção com a *Brucella* está associada a sua capacidade de evitar mecanismos extracelulares de defesa do hospedeiro, como anticorpos e complemento, e proliferar dentro dos macrófagos (SANGARI; AGUERO, 1996). No interior destas células, a *Brucella* tem a capacidade de inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, evitando a sua destruição pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (PIZARO-CERDÁ et al., 1998). Este mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro torna-se a principal base para o estabelecimento da infecção crônica.

A infecção com a *Brucella* ocorre quando a bactéria penetra na mucosa dos orifícios nasal, oral ou conjuntival. Neste nicho, ela pode infectar tanto células epiteliais quanto neutrófilos e macrófagos (GORVEL; MORENO, 2002). Uma vez dentro da célula, a sobrevivência da bactéria depende de sua capacidade em evitar a fusão do fagossomo com o lisossomo. Tem sido proposto que a interação do LPS liso com as balsas lipídicas presentes na superfície do macrófago permite a *Brucella* entrar na célula através de uma via que evita a fusão do fagossomo com o lisossomo. Além disso, foi descrito um mecanismo adicional usado pela *Brucella* para evitar a fusão do lisossomo com o fagossomo. Este mecanismo envolve um polissacarídeo periplasmático chamado ciclo β -1,2-glicano. Esta molécula parece interferir com a maturação do vacúolo bacteriano através da desorganização das balsas lipídicas presentes na membrana do fagossomo o que, conseqüentemente, evita a fusão com o lisossomo (ARELLANO-REYNOSO et al., 2005).

Apesar da ausência da fusão com lisossomos, o vacúolo contendo *Brucella* (BCV) interage com a via endocítica sofrendo acidificação. Curiosamente, a acidificação do fagossomo é utilizada pelo patógeno para perceber a maturação deste compartimento sendo necessária para a sobrevivência e replicação da bactéria na célula (PORTE et al., 1999). Aproximadamente uma hora após a internalização, a bactéria se encontra em um compartimento multimembranoso repleto de proteínas LAMP1 (proteína de membrana associada ao lisossomo) (PIZARRO-CERDÁ et al., 1998). Após este estágio, o vacúolo contendo *Brucella* interage fisicamente com o retículo endoplasmático de forma dependente de um sistema de secreção tipo IV (T4SS), codificado por componentes do operon VirB, convertendo assim o vacúolo em um compartimento derivado do retículo endoplasmático e permissivo para a replicação da bactéria que vai ocorrer no período de 12 horas após a infecção (CELLI et al., 2003).

1.1.4.1 Patogênese no Homem

Após a infecção, a bactéria penetra através da mucosa e atinge a corrente sanguínea, permitindo a sua disseminação através do sangue (COLMENERO,

1996). O período de incubação é de geralmente 1 a 3 semanas, mas pode ser por vários meses antes que iniciem os sinais de infecção. A infecção por *B. melitenses* é aguda ao contrário da infecção por outras espécies que é de caráter subagudo e prolongado (MANTUR et al., 2007).

Os sintomas mais comuns da Brucelose humana incluem febre ondulante, no qual a temperatura pode variar de 37° pela manhã a 40° durante a tarde, suores noturnos com odores peculiares, calafrios e fraqueza. Outros sintomas comuns também incluem mal-estar, insônia, anorexia, dor de cabeça, artralgia, constipação, impotência sexual, nervosismo e depressão (ACHA et al., 2003).

A Brucelose humana é conhecida também por complicações e envolvimento dos órgãos internos. Os sintomas podem ser diversos e dependem do sítio de infecção, incluindo encefalite, meningite, espondilite, artrite, endocardite, orquite e prostatite (ACHA et al., 2003). Aborto espontâneo principalmente no primeiro e segundo trimestre de gravidez também ocorre em mulheres grávidas infectadas (KHAN et al., 2001).

Embora complicações sejam raras, a endocardite ocorre em cerca de 2% dos casos associada principalmente a infecção por *B. melitenses*, sendo a complicação mais severa, caracterizando aproximadamente 80% das mortes devido a Brucelose (REGUERA et al., 2003).

Os sintomas e sinais da Brucelose geralmente referidos como febre de origem desconhecida são bastante comuns e por isso podem ser confundidos com diversas outras doenças, o que dificulta o diagnóstico (MANTUR et al., 2007). Esta falta de diagnóstico geralmente resulta na ausência de tratamento adequado o que, durante a fase aguda, pode resultar na disseminação do patógeno para vários órgãos e tecidos, culminando em uma doença subaguda ou crônica de difícil tratamento (YOUNG, 1995).

1.1.4.2- Patogênese no Animal

Como já mencionado, a principal linhagem que infecta o gado é a *B. abortus*, mas estes animais podem ser transitoriamente infectados pela *B. suis* ou pela *B. melitensis* quando compartilham o pasto ou instalações com porcos, cabras ou ovelhas infectadas (ACHA et al., 2003; EWALT et al., 1997; KAHLER, 2000).

No gado, o principal sintoma da Brucelose é o aborto (nascimento prematuro ou nascimento de bezerros fracos ou mortos), que geralmente ocorre no segundo semestre da gestação, com retenção de placenta e metrite. O aborto com a eliminação da placenta altamente colonizada é uma das principais fontes de infecção, podendo ser ingerida por outros animais (ACHA et al., 2003).

Pelo fato da *Brucella* é capaz de se localizar nos linfonodos supra-mamários e glândulas mamárias de 80% dos animais infectados, é comum a ocorrência de uma redução de aproximadamente 25% na produção de leite em vacas infectadas. Entretanto, como a produção de leite não cessa, o animal continua a secretar o patógeno no leite por toda vida (HAMDY; AMIN, 2002), podendo inclusive contaminar bezerros sadios (CRAWFORD et al., 1990).

O principal agente etiológico da Brucelose em cabras é a *B. melitensis* embora, no Brasil, exista uma grande incidência de cabras infectadas com *B. abortus*. De forma semelhante ao que ocorre no gado, a Brucelose em cabras é caracterizada por aborto tardio, natimortos, diminuição da fertilidade e baixa produção de leite (LILENBAUM et al., 2007).

Em ovelhas, a doença pode ser dividida em Brucelose clássica e epididimite. A segunda é normalmente causada pela *B. ovis*, enquanto a Brucelose clássica é causada pela *B. melitensis*. Ambas constituem um grande problema de saúde pública (ACHA et al., 2003). Já em suínos, além do aborto, a infecção por *Brucella* também pode levar a orquite, claudicação, paralisia dos membros inferiores, espondilite além de metrite ou abscesso (GLYNN; LYNN, 2008).

Nos cães, o principal agente etiológico desta patologia é a *B. canis*, mas casos esporádicos de Brucelose em cães causado por *B. abortus*, *B. suis* e *B. meli-*

tensis também já foram relatados (ACHA et al., 2003). Cães infectados por *B. canis* podem apresentar aborto durante o último trimestre de gestação, nascimento de natimortos ou falhas na concepção além de outras condições não relacionadas a reprodução como lesões oculares, musculoesqueléticas e dermatológicas (ACHA et al., 2003; WANKE, 2004).

1.1.6 Diagnóstico, Tratamento e Prevenção

Em se tratando da Brucelose, os testes diagnósticos podem ser utilizados com diferentes objetivos: diagnóstico confirmatório, estudos de triagem ou prevalência do patógeno, certificação e, em regiões onde a Brucelose está erradicada, vigilância com a finalidade de evitar a reintrodução da doença através da importação de animais ou produtos destes que estejam infectados (GODFROID et al., 2010).

Em geral, os métodos diagnósticos mais usados para a Brucelose incluem os testes diretos, como métodos de detecção baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) e análises microbiológicas; além dos testes indiretos que podem ser *in vitro* (utilizando leite ou sangue) ou *in vivo* (reações de hipersensibilidade). Apesar dos diversos métodos existentes, o isolamento da bactéria ou a detecção do DNA da *Brucella* por PCR são os únicos métodos que permitem o diagnóstico definitivo. A escolha de uma estratégia de diagnóstico em particular vai depender principalmente da situação epidemiológica da Brucelose naquele país ou região (GODFROID et al., 2010).

Segundo o Programa Nacional de Controle da Brucelose e Tuberculose animal (PNCBT) os métodos diretos de diagnóstico utilizados no Brasil são o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica e métodos de detecção de ácidos nucleicos (PCR). Já os métodos indiretos consistem primariamente na detecção de imunoglobulinas nos fluidos corporais como soro, leite, muco vaginal e sêmem (BRASIL, 2006).

O tratamento da Brucelose é feito basicamente através da antibioticoterapia, que produz alívio da sintomatologia, diminuição da duração da doença e redução

da incidência de complicações. *In vitro*, vários antimicrobianos são ativos contra a *Brucella*, mas nem sempre há correspondência com a sua eficácia clínica devido ao nicho intracelular deste patógeno. Os antimicrobianos mais utilizados são as tetraciclinas, os aminoglicosídeos, a rifampicina, o cotrimoxazol, as quinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração. A escolha da associação de antibióticos está em dependência direta de vários fatores, nomeadamente a idade, gravidez, toxicidade potencial e gravidade do quadro clínico (PESSEGUEIRO, 2003).

O tratamento mais adequado para a Brucelose é a combinação de dois antibióticos, uma vez que a monoterapia, com uso de um tipo de antibiótico, está associada à alta incidência de recidiva da doença (SELEEM et al., 2009; SOLERA et al., 1997). A combinação de doxiciclina com estreptomicina é atualmente a melhor opção terapêutica, com menos efeitos adversos e menos recidivas da doença, especialmente nos casos de Brucelose aguda e localizada (ALP et al., 2006; ARIZA et al., 1992; ERSOY et al., 2005; FALAGAS; BLIZOTIS, 2006). Conforme já explicitado a localização intracelular da *Brucella* e a sua capacidade de se adaptar as condições ambientais encontradas em seu nicho replicativo levam a uma alta incidência de falha do tratamento e de recidivas da doença (PAPPAS et al., 2005, 2006a).

A prevenção da Brucelose é realizada principalmente através do controle da doença no animal hospedeiro, uma vez que não existem formas eficazes de imunização em humanos. Assim, a vacinação animal é uma atividade fundamental de controle e prevenção dessa doença, principalmente em regiões com alto índice de incidência. Atualmente, duas linhagens vacinais têm sido utilizadas com boa efetividade na imunização do gado: a *B. abortus* S19 e a *B. abortus* RB51 (MORIYON et al., 2004).

A *B. abortus* S19 é a linhagem espontaneamente atenuada descoberta pelo Dr. John Buck em 1923. Essa linhagem apresenta uma aparência lisa devido a presença do lipopolissacarídeo (LPS) completo, composto de lipídeo A, moléculas de açúcar e o antígeno O. A *Brucella* S19 virulenta tem sido usada em todo o mundo desde 1930 como uma vacina eficaz para prevenir a Brucelose em bovinos (apud CRASTA et al., 2008). De forma similar as linhagens virulentas de *B. abortus*, o LPS de S19 contém a cadeia O lateral que é a principal responsável por uma res-

posta de anticorpo imunodominante após a vacinação ou infecção (WOODARD, 1981).

A linhagem RB51 de *B. abortus* é um mutante rugoso espontâneo selecionado após repetidas passagens da bactéria *B. abortus* 2308 em meio contendo rifampicina e penicilina (SCHURING et al., 1991). Essa linhagem acumula apenas pequenas quantidades da cadeia O lateral, apresentando uma aparência rugosa (CLOECKAERT, 2002). Aprovada para o uso no gado em 1996, a linhagem de *B. abortus* RB51 induz a produção de anticorpos que não causam interferência com a sorologia convencional, garantindo estabilidade e eficácia a essa vacina (STEVENS et al., 1994).

Apesar da eficácia, ambas as vacinas da linhagem bacteriana lisa ou rugosa possuem algumas características indesejáveis: a cepa S19 possui potencial de causar doença em seres humanos, pode ser abortiva para fêmeas grávidas, ser secretada no leite e induzir uma resposta imune que pode ser difícil de distinção da infecção, particularmente quando animais adultos são vacinados. Já a cepa RB51 é resistente a rifampicina que é um dos antibióticos de escolha para o tratamento da Brucelose humana (ARIZA, 1999). Além disso, um dos problemas inerentes às linhagens rugosas vacinais da *Brucella*, é que elas podem ser muito atenuadas, o que resulta em uma baixa persistência no hospedeiro e, conseqüentemente, podem não induzir uma imunidade protetora eficiente (UGALDE et al., 2003). Portanto, muitos esforços têm sido focados na construção de uma vacina que seja capaz de induzir forte imunidade celular e conseqüentemente, níveis de proteção adequados (MONREAL et al., 2003, VEMULAPALLI et al., 2000;), além de novos compostos adjuvantes capazes de potencializar as vacinas já existentes.

1.2 A resposta imune contra a bactéria

Para uma resposta imune efetiva contra bactérias intracelulares como a *B. abortus*, é necessário que as células infectadas destruam o microorganismo invasor ou sejam mortas, permitindo assim a ação de mecanismos extracelulares da resposta imune como anticorpos ou complemento. Assim, a resposta imune do

hospedeiro contra a infecção pela *B. abortus* envolve tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa (GOLDING et al., 2001).

1.2.1 Imunidade Inata

A imunidade inata é o mecanismo filogeneticamente mais antigo de defesa contra microorganismos, estando presente em todos os organismos multicelulares. Este tipo de imunidade atua como uma primeira linha de defesa contra infecções e consiste de barreiras epiteliais, fagócitos (como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), células NK (*natural killer*), proteínas como as do sistema do complemento e citocinas (ABBAS et al., 2012).

A resposta imune contra bactérias intracelulares como a *Brucella* se inicia com o reconhecimento do microorganismo por células da imunidade inata tais como macrófagos e células dendríticas, conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs). Este reconhecimento ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), dentro os quais se destacam os receptores do tipo Toll (TLRs), presentes na membrana plasmática ou em compartimentos intracelulares da APC. O reconhecimento da *Brucella* através destes receptores resulta na ativação das APCs e na internalização da bactéria (MACEDO et al., 2008, HUANG et al., 2005). Além disso, a ativação destes receptores aumenta a eficiência da apresentação antigênica e induz a liberação de citocinas como TNF- α e a IL-12 que possuem ações em diferentes tipos celulares (ABBAS et al., 2012).

Embora ainda não sejam conhecidos todos os receptores do tipo toll envolvidos no reconhecimento da *B. abortus*, vários trabalhos tem demonstrado o envolvimento dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 (HUANG et al., 2003; CAMPOS et al., 2004; HUANG et al., 2005; WEISS et al., 2005; COPIN et al., 2006, MACEDO et al., 2008). Dentre estes, TLR9 parece ser o mais relevante uma vez que sua ausência leva a um considerável aumento na susceptibilidade à infecção por *Brucella*. Apesar disso, animais deficientes na molécula MyD88, um adaptador fundamental para a sinalização da maioria dos receptores Toll, apresentaram uma susceptibilidade ainda mais exacerbada que animais deficientes para TLR9, sugerindo a exis-

tência de outros receptores no reconhecimento deste patógeno (MACEDO et al., 2008).

Os macrófagos são elementos chave na resposta imune inata contra a *Brucella* uma vez que são os principais locais de sobrevivência e replicação da bactéria. Macrófagos ativados estão preparados para a fagocitose e para a destruição do patógeno através de seus produtos bactericidas, tais como as enzimas hidrolíticas degradativas, acidificação do fagolisossomo, defensinas, privação nutricional e explosão oxidativa. No contexto de uma infecção por *Brucella*, a indução de superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO) são de fundamental importância (BALDWIN; GOENKA, 2006; GROSS et al., 2004).

Além dos produtos já citados, ao serem estimulados pelo microrganismo, os macrófagos são capazes de produzir diversos tipos de citocinas e quimiocinas, dentre as quais a IL-12 e o TNF- α possuem papel de destaque. A IL-12 é capaz de induzir a formação de um perfil de resposta do tipo T_H1 caracterizado pela intensa produção da citocina IFN- γ . Essa última possui um papel importante em ativar os macrófagos e limitar a infecção pela *Brucella*, sendo apontada como a citocina de maior relevância no combate a este patógeno (MURPHY et al., 2001). Já o TNF- α aumenta fortemente a atividade bactericida dos fagócitos além de estar envolvido nos processos patológicos (GOLDING et al., 2001; BALDWIN; GOENKA, 2006; YINGST et al., 2003).

As células dendríticas (DCs) também estão envolvidas na resposta imune inata frente a infecção pela *Brucella* uma vez que também podem ser alvo da infecção (BILLARD et al., 2007). Estas células apresentam atividade importante na defesa do hospedeiro internalizando patógenos no sítio de infecção e migrando para os órgãos linfóides secundários. Nesses locais, apresentam peptídeos derivados do patógeno para linfócitos T naives, conduzindo a imunidade adaptativa (SKENDROS et al., 2011). Em concordância, Huang e colaboradores (2001) demonstraram que a estimulação de células dendríticas por *B. abortus* leva a produção de IL-12 e migração para áreas de células T no baço, promovendo assim a apresentação de antígenos da *Brucella* em um micro-ambiente rico em IL-12.

As células NK (*Natural Killer*) também podem participar na resposta imune inata contra a *Brucella*. Foi demonstrado que a *Brucella* é capaz de ativar as célu-

las NK através da indução da liberação de IL-12 pelas APCs. Esta citocina estimula as células NK a secretarem IFN- γ que, como já dito, auxilia no estabelecimento de uma resposta T_H1 e estimula as atividades bactericidas dos macrófagos. Além disso, a IL-12 aumenta a capacidade dos linfócitos NK de destruir células infectadas por bactérias intracelulares como a *Brucella* (BIRON, 1999). Entretanto, apesar dessas importantes características, a depleção das células NK *in vivo* não altera a capacidade de camundongos infectados de conter a infecção por *B. abortus*. Tal fato não exclui estas células da participação na resposta contra *Brucella*, mas evidencia que outros mecanismos são capazes e suficientes para controlar a infecção mesmo na ausência das células NK (FERNANDES et al., 1995).

1.2.2 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa em resposta a *Brucella* utiliza-se basicamente de três mecanismos. Primeiro, o IFN- γ produzido pelos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ que ativam as funções bactericidas dos macrófagos para eliminar a bactéria. Segundo, a citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ que destroem os macrófagos infectados pela *Brucella*; e terceiro, anticorpos IgG2a e IgG3, típicos do perfil T_H1, que opsonizam o patógeno para facilitar a fagocitose (KO; SPLITTER, 2003).

Uma resposta imune adaptativa efetiva contra *B. abortus* requer uma imunidade mediada por células promovida pela ativação das células T específicas (OLIVEIRA et al., 1998). As células T reconhecem os antígenos bacterianos através dos receptores α/β associados a moléculas co-receptoras CD4⁺ nas células T helper ou CD8⁺ nas células T citotóxicas, após estes antígenos terem sido processados e apresentados via MHC de classe II ou I respectivamente (JANEWAY, 1992; WYCKOFF, 2002). A ativação da célula T CD4⁺ é estimulada pela IL-12 secretada por macrófagos infectados (JONES; WINTER, 1992; JIANG; BALDWIN, 1993). A IL-12 promove a diferenciação do linfócito T helper para o fenótipo T helper 1 (T_H1) que é o tipo celular mais significativo na resposta imune contra a *B. abortus*. Esta citocina também está envolvida na ativação dos linfócitos T CD8⁺ (ZHAN et al., 1993).

Após a diferenciação para o perfil T_H1, células T CD4⁺ e T CD8⁺ ativadas produzem IFN- γ que irá desempenhar um papel crucial na imunidade contra *Brucella* (BALDWIN, 1994; SPLITTER et al., 1996). A maior função do IFN- γ na imunidade à *Brucella* é o estímulo da atividade bactericida dos macrófagos infectados por essa bactéria. Entretanto, sua função é mais diversa e inclui o estímulo da apresentação de antígenos através das moléculas de MHC de classe I e II (BOEHM, 1997); estímulo da produção de intermediários reativos de oxigênio e intermediários de nitrogênio pelos macrófagos (STUEHR; MARIETTA, 1987); além de induzir a troca de isótipo de imunoglobulina para o isótipo IgG2a. Este isótipo é fixador de complemento, favorece a fagocitose do microrganismo e assim aumenta a proteção contra o patógeno (GOLDING et al., 2001).

Vários estudos evidenciaram a importância do IFN- γ para o controle da Brucelose. Stevens e colaboradores (1992) demonstraram que camundongos BALB/c infectados por *B. abortus* e suplementados com IFN- γ recombinante tiveram aumento da resistência ao patógeno, o que foi evidenciado pela queda no número de bactérias, já na primeira semana após a infecção. Além disso, outros trabalhos demonstraram que a depleção do IFN- γ através da administração de anticorpos monoclonais, resultou em aumento de 10 vezes no número de bactérias recuperadas dos animais após uma semana infecção (FERNANDES et al., 1995; ZHAN et al., 1993). Mais recentemente, a importância do IFN- γ em infecções por *Brucella* foi demonstrado, de forma conclusiva, usando camundongos BALB/c e C57BL/6 “knockouts” para IFN- γ . Ambas as linhagens não foram capazes de montar uma resposta imune efetiva e sucubiram após a infecção por *B. abortus* S2308 (MURPHY et al., 2001).

Linfócitos T CD8⁺ também possuem um papel importante na resposta imune contra a *Brucella*. Após o reconhecimento antigênico, estas células se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs) que reconhecem e eliminam células-alvo infectadas através da liberação de proteínas citotóxicas (como perforinas e granzimas). Além disso, os CTLs também são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ e TNF- α , que ativam os fagócitos (OLIVEIRA; SPLITTER, 1995; OLIVEIRA et al., 2002). A grande contribuição dos linfócitos T CD8⁺ no controle da Brucelose foi efetivamente determinada por Oliveira e Splitter (1995). Utili-

zando animais deficientes para as moléculas de MHC de classe I, estes pesquisadores mostraram que a Brucelose murina foi exacerbada em camundongos que não apresentavam resposta através dos linfócitos T CD8⁺ (MHC classe I) quando comparada a animais normais ou deficientes na resposta por células T CD4⁺ (MHC classe II), evidenciando claramente o impacto das células T CD8⁺ na imunidade mediada por células no controle da Brucelose experimental. Além disso, este trabalho sugere que os linfócitos TCD8⁺ apresentam um papel mais relevante do que os linfócitos T CD4⁺, neste modelo de infecção.

Recentemente, trabalhos realizados por Brandão e colaboradores (2012) confirmaram a importância de uma resposta T_H1 e das células T CD8⁺ no combate a infecção por *Brucella*. Neste estudo, os autores avaliaram a susceptibilidade de animais deficientes para a molécula β2-microglobulina (componente do MHC de classe I) e da citocina IL-12. Conforme esperado, animais deficientes destas moléculas apresentaram elevada susceptibilidade a *B. abortus* quando comparado aos animais normais. Além disso, essa maior susceptibilidade foi relacionado a menor produção de IFN-γ e a incapacidade dos linfócitos em lisar macrófagos infectados com *Brucella*, confirmando assim o papel crucial executado por esses componentes no combate a Brucelose.

Além da resposta celular, a imunidade humoral também é ativada em resposta a infecção por *B. abortus*. Neste contexto, os anticorpos têm o papel de opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção, tornando a fagocitose pelos macrófagos mais eficiente. Porém, os anticorpos não reduzem a taxa de crescimento intracelular de *B. abortus in vivo* e não conferem resistência a camundongos susceptíveis. A habilidade da bactéria de sobreviver e replicar dentro do macrófago e outras células do hospedeiro torna-a inacessível a mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS; HO, 1983).

1.3 A Talidomida

1.3.1 Histórico

A Talidomida, [(±)2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1H-isoindol- 1,3-(2H)-diona; ou (±)- talimidoglutarimida (1)] (**Figura 5**), é um derivado sintético do ácido glutâmico que foi descoberta por Wilhelm Kunz em 1953 (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001) e foi desenvolvida pela companhia alemã Grunenthal (BARTLETT et al., 2004).

Considerada um sedativo e tranquilizante seguro, foi inicialmente comercializada sem prescrição médica e distribuída para cerca de 40 países sendo indicada principalmente para o mal estar matinal comum em mulheres gestantes (BARTLETT et al., 2004).

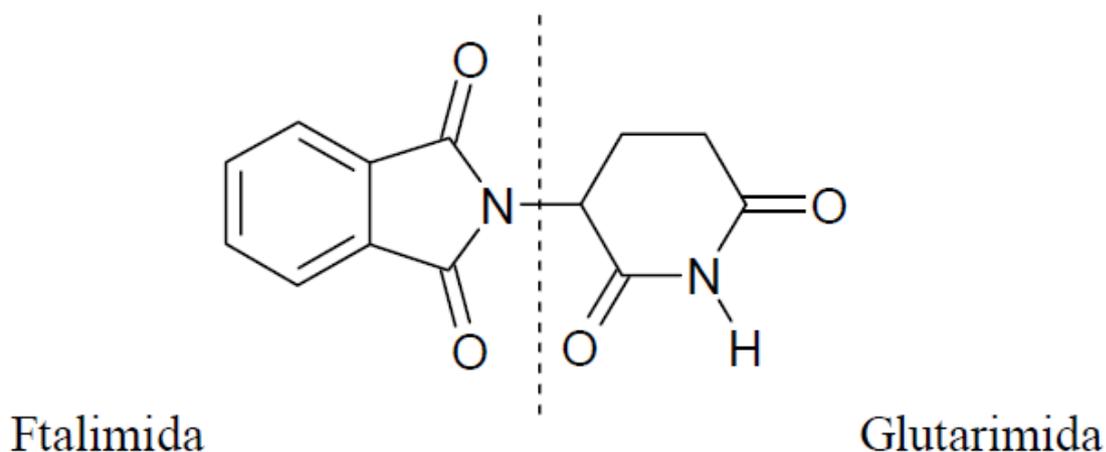


Figura 5: Estrutura da Talidomida (BORGES ; FRÖEHLICH, 2003).

Em 1957, a Talidomida foi comercializada como um fármaco sedativo-hipnótico e amplamente vendida em países europeus, asiáticos, no Canadá e América do Sul, tornando-se o medicamento mais vendido na Alemanha Ocidental para o tratamento da insônia (POWELL, 1996; RAJE; ANDERSON, 1999).

Entretanto, em 1961, dois médicos, trabalhando de forma separada, suspeitaram da existência de uma ligação entre o nascimento de crianças com malforma-

ção e a utilização da Talidomida no primeiro trimestre da gravidez. Apesar disso, esta droga foi responsável pelo nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas, o que foi posteriormente atribuído ao seu perfil teratogênico (CHEYMOL, 1965; LENZ, 1962; MCBRIDE, 1961). Assim, após três anos de comercialização e após intensa pressão da imprensa, a Talidomida foi retirada do mercado em 1961, deixando para trás o trágico saldo de 8.000 crianças com malformação congênita em 46 países, inclusive no Brasil. Após a confirmação e divulgação destes graves efeitos colaterais, este fármaco teve sua licença para comercialização cancelada (OLIVEIRA, 1998).

O exato mecanismo de teratogenicidade desencadeado pela Talidomida é um longo mistério que tem sido objeto de pesquisas intensivas (D'AMATO et al., 1994). Estudos usando coelhos sugerem que a anti-angiogênese induzida pela droga em conjunto com o estresse oxidativo, são as possíveis causas dos efeitos teratogênicos (PARMAN et al., 1999; THERAPONTOS et al., 2009). Apesar disso, questões fundamentais ainda permanecem sem resposta, tais como os alvos diretos da Talidomida e os meios pelos quais os alvos moleculares mediam os efeitos da droga. A identificação e subsequente caracterização funcional dos alvos da Talidomida são etapas essenciais para decifrar o mistério desse mecanismo (ITO et al., 2010).

Após vários anos de proibição, a indústria Norte-Americana Celgene, baseada em novas descobertas das propriedades antiinflamatórias e imunorreguladoras da Talidomida, solicitou ao FDA (Food and Drug Administration - Administração de Alimentos e Medicamentos) sua aprovação para uso no tratamento da hanseníase, que foi concedida em julho de 1998. Marcava-se então o renascimento deste fármaco, que representa, atualmente, um dos principais agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento efetivo de diversas doenças, tais como lepromas, artrite reumatoide, doença de Crohn, câncer e AIDS (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001).

1.3.2 Mecanismos de Ação

A Talidomida, quando administrada como uma mistura racêmica, possui propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras que provavelmente estão

associadas a sua capacidade de afetar a produção de citocinas e função celular. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm investigado os efeitos dos enântiômeros da Talidomida de forma individual (ERIKSSON et al., 2000; ERIKSSON et al., 1998). As ações sedativas têm sido associadas ao R-enântiômero, enquanto os efeitos imunológicos estão associados ao S-enântiômero. Entretanto, quando um enântiômero específico é administrado por via oral ou endovenosa, ocorre a inversão quiral para o outro enântiômero, impedindo que haja uma separação total dos efeitos (SAMPAIO et al., 1991; MOREIRA et al., 1993).

A Talidomida é um potente inibidor da produção de TNF- α por monócitos humanos estimulados por lipopolissacarídeo. Essa inibição é devida, principalmente, ao aumento da degradação do RNA mensageiro do TNF- α por esta droga. O nível de outras citocinas como IL-1 β , IL-6 e fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), são também inibidos por essa droga, enquanto a IL-10 é estimulada (NOMAN, et al., 2009). Por diminuir a concentração de TNF- α , o qual induz a expressão de moléculas de adesão de superfície celular como ICAM-1, VCAM-1, L-selectina e E-selectina de células endoteliais, a Talidomida bloqueia a cascata de adesão e causa efeitos antivasculares que ocorrem em algumas patologias como no mieloma múltiplo (GEITZ et al., 1996). A Talidomida possui ainda um mecanismo de ação anti-proliferativo, através da inibição da produção de IL-6, além de apresentar atividade pró-apoptótica, por aumentar a sensibilidade da célula a apoptose induzida por Fas e regular a expressão de proteínas inibitórias da apoptose (HIDESHIMA et al., 2000; MITSIADES et al., 2002).

Outra atividade atribuída à Talidomida é sua propriedade anti-angiogênica, por gerar radicais hidroxila tóxicos. *In vivo*, ela demonstrou ter um efeito anti-angiogênico contra o crescimento neovascular induzido pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na córnea de coelho, assim como contra a neovascularização induzida pelo fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) ou VEGF na córnea de camundongo. *In vitro*, a Talidomida mostrou ser efetiva em inibir a proliferação celular da veia umbilical humana, além de inibir a migração e a proliferação celular epitelial do pigmento retinal (ETER; SPITZNAS, 2002).

A Talidomida também é utilizada para o tratamento da AIDS, neoplasias e como imunossupressora no tratamento de pacientes submetidos a transplante re-

nal e de medula. Há relatos também de seu uso no tratamento da artrite reumatóide, tuberculose crônica, doença de Behcet e doença de Crohn (BORGES; FROELICH, 2003).

Apesar dos eventos antinflamatórios, foi demonstrado que a Talidomida apresenta atividade co-estimulatória sobre linfócitos T humanos, sendo capaz de estimular a produção de citocinas, atividade citotóxica e proliferação. A co-estimulação envolve a entrega de um sinal secundário a células T naive para produzirem uma resposta antígeno-específica, o que confere a essa droga uma ação de adjuvante imunológico. A Talidomida causa ainda indução de uma resposta T_H1 e estimula a produção de $IFN-\gamma$ e IL-2 através da ativação do fator de transcrição ativador da proteína-1 (HASLETT; CORRAL; ALBERT, 1998).

A atividade co-estimulatória da Talidomida foi demonstrada por Haslett e colaboradores (1998). Estes autores estimularam células T purificadas com anticorpos anti-CD3, um componente do complexo TCR. Neste estudo a Talidomida forneceu um sinal co-estimulatório essencial para a proliferação da célula T e para produção de citocinas, principalmente o $IFN-\gamma$. De forma interessante, o efeito co-estimulatório da Talidomida foi mais pronunciado no subtipo $CD8^+$ das células T que no subtipo $CD4^+$. Além disso, foi observado um aumento na atividade citotóxica condizente com o aumento no número de células T citolíticas.

Em 2003, Karrow e colaboradores realizaram uma investigação para avaliar se a Talidomida poderia modular seletivamente a resposta imune e levar ao aumento ou queda da resistência a vários patógenos ou tumores. Surpreendentemente, este estudo demonstrou que o tratamento com Talidomida é capaz de aumentar significativamente a resistência do hospedeiro à infecção por *Listeria monocytogenes* e ao melanoma B16F10, mas não afeta a função do Sistema Fagocítico Mononuclear ou a resistência do hospedeiro ao *Plasmodium yoelii*, *Streptococcus pneumoniae* ou *PYB6 fibrosarcoma*. Embora o exato mecanismo para o efeito patógeno/tumor específico da Talidomida não seja totalmente claro, é provável que os efeitos modulatórios da Talidomida atuem em diferentes componentes do sistema imune e variem de acordo com o tipo de infecção presente.

Em concordância com os achados de Karrow e colaboradores (2003), estudos realizados por Guo et al. (2005) avaliando o efeito modulatório da Talidomida sobre o sistema imune com foco sobre os neutrófilos, demonstraram que o tratamento com Talidomida por 15 dias é capaz de aumentar o número de neutrófilos no baço e no fígado de animais infectados por *Listeria*. Este aumento do número de neutrófilos foi responsável pelo aumento da resistência do hospedeiro contra a infecção primária e secundária por *L. monocytogenes*, destacando a importância dos neutrófilos nos mecanismos imunomodulatórios da Talidomida.

A imunidade contra vírus também pode ser modulada através do tratamento com Talidomida. Foi demonstrado que a Talidomida, assim como seus derivados, é capaz de co-estimular linfócitos T CD8⁺ vírus específico aumentando a citotoxicidade e a produção de IFN- γ e TNF- α , mesmo em pacientes cronicamente infectados com HIV, demonstrando que a ação da Talidomida não depende de células T CD4⁺ (Haslett et al., 2003). Além disso, foi evidenciado que, em conjunto com a modulação na resposta imune celular, a Talidomida é capaz de estimular um aumento no número de células produtoras de anticorpos (antibody-formation cells) no baço, demonstrando que a droga também apresenta ação sobre a resposta humoral (Karrow et al., 2000) .

Desse modo, como a Talidomida possui um amplo mecanismo de ação, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar a influência do tratamento com Talidomida em animais infectados com *B. abortus*, além do focar no desenvolvimento de novos fármacos ou adjuvantes vacinais que auxiliem no combate a *Bru-cella*.

2 JUSTIFICATIVA

A Brucelose constitui-se um grave problema para a sanidade animal e por ser uma zoonose, afeta conseqüentemente a saúde pública da população. As manifestações patológicas da Brucelose incluem febre ondulante, artrite, endocardite e meningite em humanos, enquanto a Brucelose animal causa aborto em fêmeas gestantes. A prevalência da Brucelose animal está em torno de 5% no Brasil, e estima-se que o prejuízo causado por esta enfermidade seja de mais de 30 milhões de dólares ao ano para a economia nacional. Embora existam duas cepas vacinais vivas utilizadas no controle da Brucelose bovina (cepa S19 e cepa RB51), ambas apresentam grandes desvantagens, não podendo inclusive ser utilizadas em humanos. Assim, a prevenção desta doença depende até o momento de sua erradicação ou controle no animal hospedeiro.

A Talidomida é um derivado sintético do ácido glutâmico que possui atividade antiinflamatória, imunomodulatória e anti-angiogênicas. Diversos estudos tem evidenciado que a Talidomida é capaz de co-estimular células T induzindo sua proliferação, produção de citocinas e atividade citotóxica. Além disso, a Talidomida tem sido relacionada à formação de uma resposta T_H1 com elevada produção de IFN- γ , tendo assim um caráter adjuvante.

Assim, uma vez que uma resposta T_H1 , e conseqüente produção de IFN- γ , em conjunto com a ação dos linfócitos T $CD8^+$ é essencial para o controle da infecção pela *B. abortus*, somado ao fato da Talidomida ser capaz de agir sobre estes componentes chaves da resposta imune contra a *Brucella*, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a bactéria intracelular *Brucella abortus* no intuito de desenvolver novos fármacos ou componentes vacinais que auxiliem no combate a este patógeno.

3 OBJETIVOS

3.2 Objetivo geral

Avaliar a influência do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a bactéria intracelular *B.abortus*.

3.3 Objetivos específicos

- Avaliar a concentração de Talidomida, a forma de tratamento e o tempo capaz de influenciar na carga bacteriana presente no baço.
- Avaliar o curso da Brucelose murina em animais tratados com Talidomida
- Avaliar a produção de IFN- γ e óxido nítrico em esplenócitos de animais tratados e infectados.
- Avaliar a produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ no tecido hepático de animais tratados e infectados.
- Avaliar possíveis alterações nos tipos celulares presentes no baço de animais tratados e infectados.
- Avaliar o percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ em esplenócitos extraídos de animais tratados e infectados com *B. abortus*.
- Avaliar a atividade citotóxica de esplenócitos extraídos de animais tratados e infectados com *B. abortus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 8 e 10 semanas, pesando cerca de 20 g, que foram adquiridos do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e mantidos no Biotério do laboratório de Imunologia da Universidade de Juiz de Fora com água e ração *ad libitum*.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação animal (CEEA) da Pró-reitoria de pesquisa/UFJF sob o número de protocolo 061/2011.

4.2 Cepas bacterianas

Utilizou-se neste estudo a cepa lisa S2308 da *B. abortus* disponível em nosso laboratório.

4.3 Condições de cultivo bacteriano

A cepa S2308, que foi utilizada na infecção ou como antígeno na cultura de células, foi cultivada em meio *Brucella Broth* líquido (BB) (DIFCO), a 37°C sob agitação constante. Após três dias de crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada e o sedimento foi ressuscitado em tampão salina fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,4 (2,8 mM Na₂PO₄; 7,2 mM Na₂HPO₄; 0,14 M NaCl). Alíquotas destas culturas foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio BB solidificado com 1,5% de ágar bacteriológico. Após incubação por 72 horas a 37°C foi possível determinar a concentração bacteriana presente na suspensão por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) visualizadas na placa.

4.4 Tratamento dos animais

O protocolo de tratamento baseou-se na administração intraperitoneal de uma suspensão aquosa de Talidomida (300µL/ animal/dia) em diferentes concentrações durante 7 ou 15 dias antes ou depois da infecção. Como controles foram utilizados animais que receberam PBS (300µL/ animal/dia).

Uma vez que a Talidomida apresenta baixa solubilidade em água (PBS), a suspensão foi preparada no momento do tratamento e homogeneizada vigorosamente em vórtex a cada aplicação.

4.5 Infecção

Após a realização do protocolo de tratamento, os animais tratados ou controles foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC da cepa virulenta S2308 da *B. abortus*. Após os tempos determinados, esses camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada do baço e do fígado.

4.6 Carga bacteriana

O baço extraído de cada animal foi macerado em 10 mL de PBS, com o auxílio de uma peneira de aço, e serialmente diluído. As diluições foram plaqueadas, em duplicata, em meio BB ágar e incubadas. Após 3 dias de incubação à 37°C, o número de unidades formadoras de colônia foi determinado. Os resultados foram expressos como a média do log de UFC de cada animal. As células excedentes do baço foram utilizadas nas culturas de esplenócitos.

4.7 Avaliação do curso da Brucelose murina em animais tratados com Talidomida

Após a determinação do tratamento adequado, foi avaliado o curso da Brucelose murina em animais tratados com Talidomida. Para isso, camundongos foram tratados ou não com Talidomida (150mg/Kg/dia) e infectados intraperitoneal-

mente com 10^6 unidades formadoras de colônias de *B. abortus*. Uma, três e seis semanas após a infecção, 5 animais de cada grupo (Tratado ou controle) foram sacrificados por deslocamento cervical para a extração do baço e determinação da carga bacteriana, conforme descrito no item 4.6.

4.8 Cultura de esplenócitos

As suspensões de células obtidas após os baços serem macerados foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 600g. Posteriormente, o sobrenadante do centrifugado foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão ACK (1% KHCO_3 e 8% NH_4Cl em água destilada) e incubadas por 5 minutos, a temperatura ambiente, ocorrendo a lise osmótica dos eritrócitos. Após a incubação, 28 ml de PBS foram acrescentados e seguiu-se nova centrifugação.

Novamente o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 $\mu\text{g/mL}$, GIBCO). Em seguida a concentração das células foi determinada na câmara de Neubauer.

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC) e estimuladas com *B. abortus* S2308 (MOI de 100:1). Células não estimuladas (meio) foram usadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5,0 $\mu\text{g/mL}$ - Sigma) ou lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (1 $\mu\text{g/mL}$ - Sigma) serviram como controle positivo. Após 48 ou 72 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO_2 , os sobrenadantes dos esplenócitos foram coletados para a quantificação da produção de óxido nítrico ou IFN- γ .

4.9 Determinação da concentração de citocinas no tecido hepático

Para avaliação da produção de citocinas no tecido hepático, este tecido foi macerado em uma solução de extração de citocinas (NaCl 0.4M, NaPO_4 10mM, PMSF 0.1mM, cloreto de benzetônio 0.1 mM, EDTA 10mM, 0.05% de Tween 20,

0.5% BSA, 20 KI aprotinina), numa relação de 10% peso/volume. O macerado foi então centrifugado a 3.000 RPM, durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi então recolhido e testado para a concentração de TNF- α , IFN- γ e IL-12.

4.10 Dosagem de citocinas

Para a determinação da concentração de citocinas nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos ou no macerado do fígado, foi usado o teste ELISA do tipo sanduíche, usando kits comerciais (BD- Becton & Dickinson Company) conforme protocolo do fabricante.

Nos macerados do fígado foram avaliadas as citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ . Já nos sobrenadantes de cultura, foram determinadas as concentrações de IFN- γ após 72 horas de cultivo. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

4.11 Dosagem de Óxido Nítrico

Como o óxido nítrico possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção desta substância por macrófagos foi mensurada pela formação do nitrito (NO₂), através do método de Griess. Sobrenadantes das culturas celulares foram colocados em placas de 96 poços (50 μ l/poço) e misturados com 50 μ l de reagente de Griess (1% sulphanilamide/0.1% *N*-(1-naphtyl)- ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄). Após 5 minutos de incubação a reação foi lida em leitor de microplaca (Biorad) em comprimento de onda de 550 nm. A concentração de NO₂ foi obtida por comparação com uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de Na(NO₃)

4.12 Análise de Citotoxicidade

Para determinar a atividade citolítica dos esplenócitos derivados de camundongos tratados com Talidomida e infectados, foi usado o “Teste de Citotoxicidade Não-radioativo Roche”, que é baseado na detecção colorimétrica dos níveis liberados da enzima LDH. Macrófagos peritoneais (5x10⁵ células/poço) extraídos de ca-

camundongos C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* (MOI 100:1) por 2 horas. Após 24 horas de infecção, as bactérias extracelulares foram removidas. Os macrófagos infectados foram usados como células alvo para a análise da citotoxicidade. Esplenócitos (1×10^6 células/poço) obtidos de camundongos C57BL/6 uma semana após a infecção, tratados ou não com Talidomida, foram usados como células efetoras e foram co-cultivados com os macrófagos em placas de 24 poços em meio RPMI. As células efetoras foram adicionadas às células alvo em duplicata, na razão 2:1 e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ por 24 horas. Após a incubação, 50µL do sobrenadante foi coletado e plaqueado em placas de 96 poços. Controles de liberação de LDH espontânea das células efetoras e alvo, assim como a liberação máxima das células alvo, foram adicionados ao experimento. A liberação de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada segundo o protocolo do fabricante. A porcentagem de lise específica foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: [(Liberação de LDH experimental- Efetor espontâneo- Alvo espontâneo) / (alvo máximo- alvo espontâneo)] x 100%.

4.13 Contagem diferencial de células do baço

Após lavagem, lise de eritrócitos e contagem, a concentração de esplenócitos foi ajustada para 1×10^5 células/mL e estas células foram citocentrifugadas a 400 rpm por 5 minutos em lâminas de vidro. Estas lâminas foram então fixadas com metanol e coradas pelo Kit Panótico Rápido (Laborclin). As células analisadas em microscópio óptico e foram classificadas de acordo com os padrões morfológicos de identificação em: neutrófilo, linfócito, monócito/macrófago.

4.14 Análise do percentual das células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ por citometria de fluxo.

Para avaliar o percentual de células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ camundongos C57BL/6 (5 por grupo) foram tratados (150mg/kg/dia) e infectados com *B. abortus*, (1×10^6 bactérias/animal). Após uma semana de infecção (tempo no qual foi encontrada maior diferença na carga bacteriana) esses animais foram sacrificados e esplenectomizados. Os baços foram macerados com telas de metal em 10 ml de so-

lução salina e a suspensão celular centrifugada a 600g por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 2ml de tampão ACK (Ammonium-Chloride-Potássium - 1% KHCO_3 e 8% de NH_4Cl em água destilada) e incubadas por 5 minutos para realização da lise osmótica de hemáceas. Após este tempo adicionou-se solução salina até atingir o volume de 30 ml. Novamente as células foram centrifugadas e agora ressuspensas em 3 ml de meio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado com 2mM L-glutamina, 25mM HEPES, 10% de soro fetal bovino (Sigma), Penicilina (100U/ml) e Streptomycina (100 μg /ml). Após a determinação da concentração celular em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas (5 x 10⁵ células/poço) em placas de 96 poços de fundo em "U" (SARSTEDT) e iniciou-se o processo de marcação.

Primeiramente as placas contendo as células foram centrifugadas a 600g por 10 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa. As células foram então ressuspensas em 100 μL de tampão de FACS (PBS + 5% soro fetal bovino - SFB). Em seguida, as placas de cultura foram submetidas a nova centrifugação e foram adicionados, a cada poço, 20 μL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 ou anti-CD4 e anti-CD8 (Becton & Dickinson) na concentração de 0,5 μg por poço. Estes anticorpos apresentavam as marcações PE, FITC e Cy5 respectivamente. Seguiu-se então uma incubação por 20 minutos a 4°C e acrescentou-se 150 μL de PBS. Mais uma vez as placas foram incubadas por 15 minutos a 4°C e lavadas 3 vezes com 150 μL de PBS. Após a última lavagem as células foram homogeneizadas em 100 μL de PBS e transferidas para tubos específicos para FACS (CORNING). As amostras foram coletadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton & Dickinson), onde 50.000 eventos foram adquiridos.

Os resultados foram analisados pelo software CellQuest. A zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células e a porcentagem de células $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ ou $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ foi determinada.

4.15 Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados através de teste *t* de Student, utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). O nível de significância adotado nas análises foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 150mg/Kg/dia de Talidomida diminui a carga bacteriana no baço em animais tratados e infectados com *B. abortus*

Para avaliar a concentração de Talidomida capaz de alterar o número de bactérias presentes no baço, camundongos C57BL/6 foram tratados com diferentes concentrações de Talidomida (30, 50 e 150mg/kg/dia) diariamente por 7 dias, conforme previamente demonstrado (KARROW et al., 2003; KARROW et al., 2000). Após o tratamento, os animais foram infectados com *B. abortus* (10^6 bactérias/animal). Uma semana após a infecção, os animais foram sacrificados e o número de unidades formadoras de colônias foi determinado no baço.

Conforme mostrado na **Figura 6**, o tratamento com Talidomida nas concentrações de 30 ou 50 mg/kg/dia não foi capaz de alterar a carga bacteriana presente no baço dos animais tratados, quando comparados aos animais que não receberam tratamento. Entretanto, quando os animais foram tratados com Talidomida na concentração de 150mg/kg/dia, foi possível observar uma redução significativa na concentração de bactérias recuperadas no baço, sugerindo o potencial desta droga em melhorar a resposta imune do hospedeiro contra este patógeno.

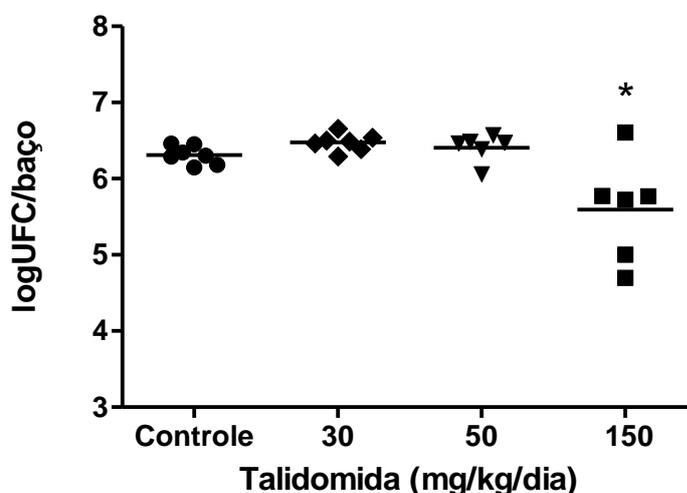


Figura 6: 150mg/kg/dia de Talidomida diminui a carga bacteriana no baço em animais tratados e infectados com *B. abortus*.

Os camundongos C57BL/6 foram tratados por 7 dias com diferentes concentrações de Talidomida (30, 50 e 150mg/kg/dia). Após o tratamento, os animais foram

infectados intraperitonealmente com 10^6 bactérias e sacrificados após uma semana de infecção. Como controles foram utilizados animais que não receberam tratamento com Talidomida. A carga bacteriana foi determinada no baço e apresentada como log do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/ baço. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Uma vez que o tratamento prévio com Talidomida na concentração de 150mg/kg/dia foi capaz de alterar a concentração de bactérias no baço, foi avaliado se o tratamento posterior à infecção também seria capaz de interferir na carga bacteriana. Para isso, animais foram infectados com *B. abortus* e tratados posteriormente com Talidomida a 150mg/kg/dia por sete dias. Conforme evidenciado pela **figura 7**, o número de bactérias recuperadas no baço de animais que receberam tratamento com Talidomida foi semelhante aquele encontrado em animais não tratados. Estes resultados demonstram que a administração de Talidomida posterior a infecção não é capaz de interferir no número de bactérias presente no baço de animais infectados. Além disso, o fato do número de bactérias não ser alterado pela administração posterior da droga sugere que este composto não deve ser tóxico para a bactéria e não deve agir diretamente sobre ela.

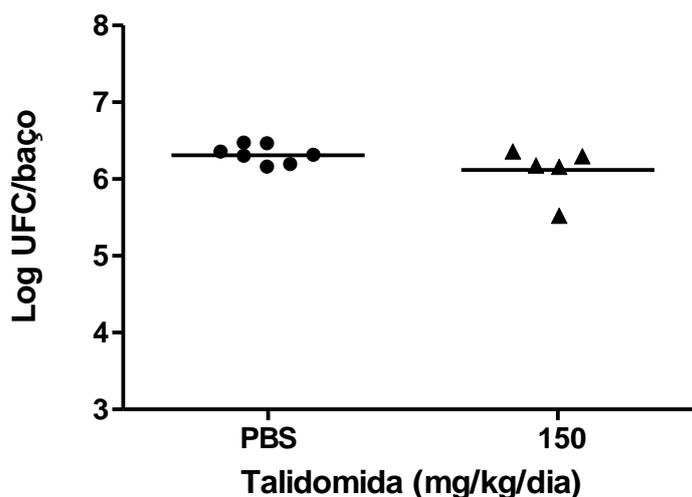


Figura 7: 150mg/kg/dia de Talidomida diminui a carga bacteriana no baço em animais tratados e infectados com *B. abortus*

Camundongos C57BL/6 foram infectados intraperitonealmente com 10^6 bactérias e tratados posteriormente com Talidomida a 150mg/kg/dia por sete dias. Como controles foram utilizados animais que não receberam tratamento com Talidomida. A carga bacteriana foi determinada no baço e apresentada como log do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/ baço.

5.2 Tratamento por 7 dias reduz a carga bacteriana no baço de animais tratados e infectados por *B. abortus*.

Uma vez que a concentração e a forma de tratamento com Talidomida foram determinadas, avaliamos o melhor tempo de tratamento capaz de influenciar na carga bacteriana. Para isso, animais foram tratados com Talidomida (150mg/kg/dia) por 7 ou 15 dias e infectados com *B. abortus*. Como mostrado na **figura 8**, não foi observada diferença significativa entre a concentração de bactérias recuperadas do baço de animais tratados com Talidomida por 7 ou 15 dias. Dessa forma, de acordo com os resultados apresentados, determinamos o tratamento prévio com Talidomida na concentração de 150mg/kg/dia durante 7 dias como o mais adequado no nosso modelo de infecção e utilizamos este protocolo para todos os experimentos futuros.

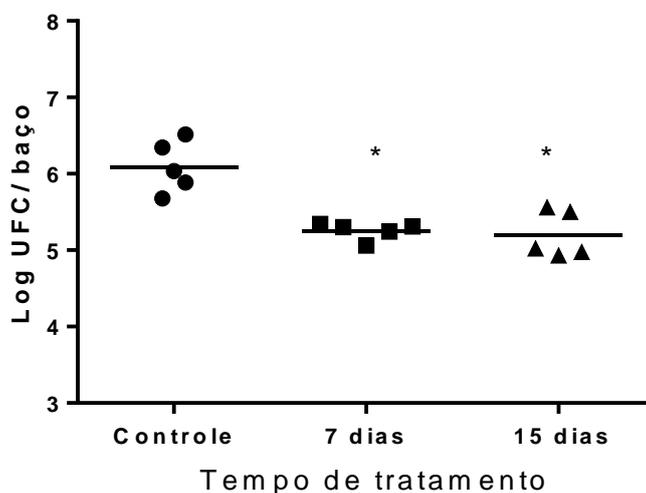


Figura 8: Tratamento por 7 dias reduz a carga bacteriana no baço de animais tratados e infectados por *B. abortus*.

Animais foram tratados com Talidomida (150mg/kg/dia) por 7 ou 15 dias e infectados com *B. abortus* (10^6 bactérias/animal) Como controle foram utilizados animais que não receberam tratamento com Talidomida. A carga bacteriana foi determinada no baço e apresentada como log do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/baço.

5.3 Talidomida reduz a carga bacteriana do baço em todos os tempos de tratamento em animais tratados e infectados por *B. abortus*

Para verificar a influência do tratamento na resposta imune contra a *Brucella*, o número de bactérias foi monitorado no baço de animais tratado ou não, durante 1,3 e 6 semanas após infecção. Semanalmente, grupos de animais foram sacrificados e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado. Notadamente, a Brucelose murina mostrou-se diminuída em todos os tempos avaliados em camundongos que receberam tratamento prévio com Talidomida, comparado aos animais do grupo controle, permanecendo assim durante todo o período experimental (**Figura 9**). Embora tenha sido observada uma diferença significativa entre tratados e controles durante toda a cinética, esta diferença foi mais acentuada na primeira semana após a infecção, chegando a cerca de 0,8 log.

Estes dados evidenciam, mais uma vez, que o tratamento prévio com Talidomida é capaz de alterar a resposta imune do hospedeiro de forma a aumentar a eficiência de combate à infecção.

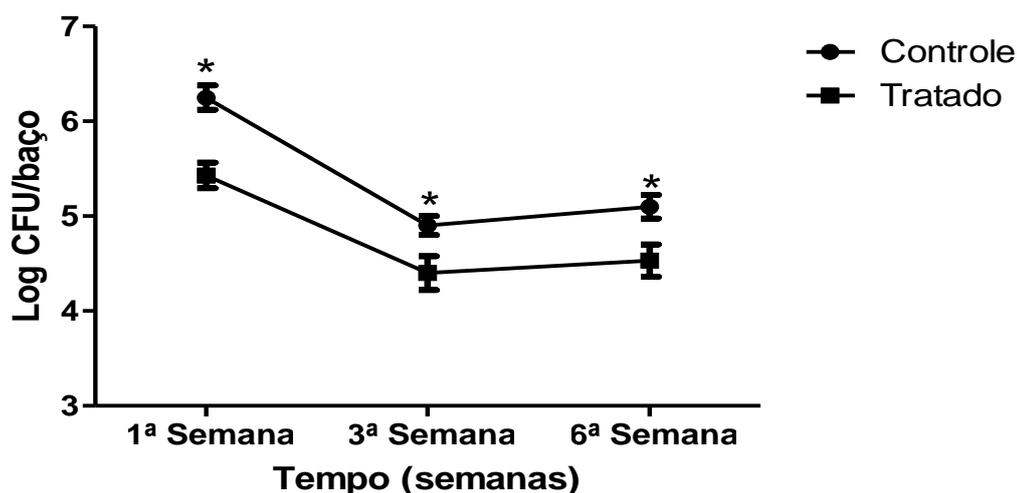


Figura 9: Talidomida reduz a carga bacteriana do baço em todos os tempos de tratamento em animais tratados e infectados por *B. abortus*

Camundongos foram tratados por 7 dias com Talidomida (150mg/Kg/dia) e infectados intraperitonealmente com *B. abortus* S2308 (1×10^6 bactérias/animal). Após 1,3 e 6 semanas o número de unidade formadoras de colônias (UFC) presentes no baço foi determinado. (*) significativo em relação ao animal C57BL/6. $p < 0.05$.

5.4 Talidomida aumenta a produção de IFN- γ em esplenócitos estimulados com *B. abortus*.

Resistência a patógenos intracelulares facultativos como a *Brucella* depende basicamente da resposta celular adquirida caracterizada pela ativação de linfócitos T e subsequente ativação e aumento do poder bactericida de macrófagos. Interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina diretamente envolvida neste processo e de fundamental importância no controle da Brucelose murina (KO et al., 2002). Assim, uma vez que o tratamento com Talidomida foi capaz de diminuir a carga bacteriana presente no baço de animais tratados, avaliamos se esta menor susceptibilidade está relacionada à alteração na produção de IFN- γ . Para isso, células extraídas do baço de animais tratados com Talidomida e infectados com *B. abortus* (conforme protocolo padronizado) foram cultivadas na presença ou não de *B. abortus*. Após 72 horas de cultivo, a concentração de IFN- γ foi determinada no sobrenadante das culturas por ELISA.

Conforme demonstrado na **figura 10** e acordando com dados da literatura (MACEDO et al., 2008), esplenócitos de animais previamente infectados com *B. abortus* produzem quantidades elevadas de IFN- γ quando estimulados novamente com a bactéria. Entretanto, esplenócitos provenientes de animais que receberam tratamento prévio com Talidomida foram capazes de produzir quantidades significativamente maiores de IFN- γ comparados aos animais que não receberam tratamento, demonstrando que a Talidomida também influencia a produção desta citocina. Uma vez que o IFN- γ é essencial na resposta imune contra este patógeno, a diminuição da carga bacteriana encontrada em animais tratados pode estar relacionada à maior produção desta citocina no baço.

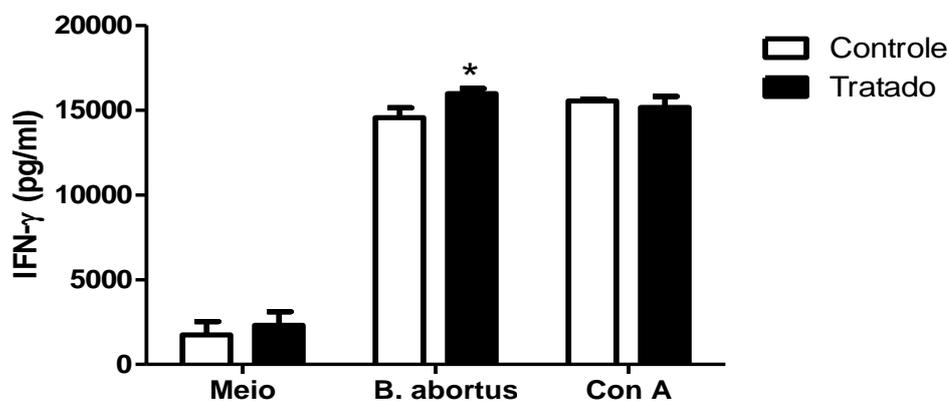


Figura 10: Talidomida aumenta a produção de IFN- γ em esplenócitos estimulados com *B. abortus*.

Animais foram tratados com Talidomida (150mg/kg/dia) durante sete dias e infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal). Após uma semana de infecção, células do baço foram retiradas e cultivadas por 72 horas na presença dos estímulos *B. abortus* S2308 (10^2 bactérias/célula) ou Concanavalina A ($5\mu\text{g/ml}$). A concentração da citocina foi determinada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. (*) significativo em relação aos animais não tratados. $p < 0,05$.

5.5 Talidomida aumenta a produção de Óxido Nítrico em resposta a *Brucella*.

A produção de óxido nítrico (NO) é um típico componente da resposta imune conhecido como um mecanismo de defesa contra vários patógenos além de ser capaz de induzir apoptose (ABBAS; LICHTMAN, 2012). Wang e colaboradores (2001) mostraram que na presença de NO, o número de bactérias sobreviventes no interior de macrófagos diminuía consideravelmente durante as primeiras 24 horas. Além disso, estes autores evidenciaram que, na presença da citocina IFN- γ , as concentrações de NO aumentavam significativamente. Assim, uma vez que animais tratados com Talidomida apresentam menor carga bacteriana no baço e maior produção de IFN- γ por esplenócitos, avaliamos se o tratamento também influenciou a produção de NO. De fato, como mostrado na **figura 11**, esplenócitos derivados de animais tratados com Talidomida foram capazes de produzir níveis maiores de óxido nítrico quando estimulados com *B. abortus*, comparados aos níveis produzidos por animais que não sofreram tratamento. Estes achados sugerem que a diminuição da carga bacteriana encontrada em animais tratados com Talidomida é resultado da maior produção de óxido nítrico, provavelmente estimulada pelo aumento na concentração de IFN- γ .

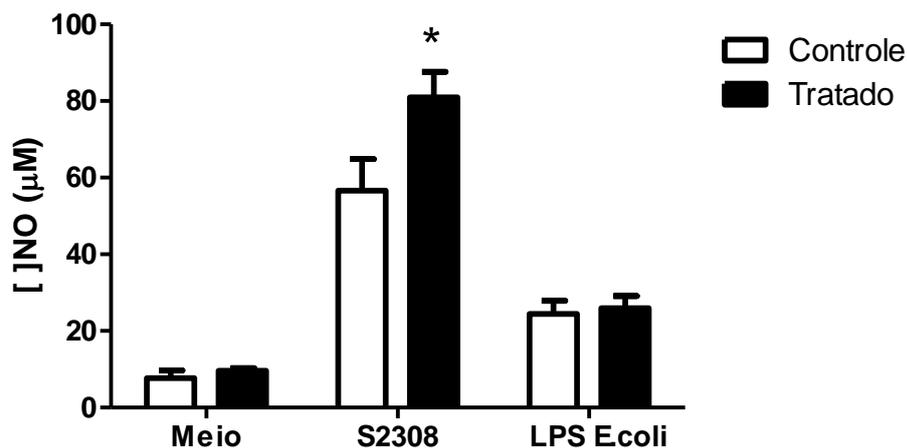


Figura 11: Talidomida aumenta a produção de Óxido Nítrico em resposta a *Brucella*.

Animais foram tratados com Talidomida (150mg/kg/dia) durante sete dias e infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal). Após uma semana da infecção, células do baço foram retiradas e cultivadas por 48 horas na presença dos estímulos *B. abortus* S2308 (10^2 bactérias/célula) ou LPS de *E.coli* (1μg/ml). A concentração de óxido nítrico foi determinada pelo teste de Greiss. (*) significativo em relação aos animais não tratados. $p < 0,05$.

5.6 Talidomida aumenta a concentração de citocinas no tecido hepático.

O fígado executa um importante papel na resposta imune, conferindo uma importante linha de defesa contra microrganismos e toxinas que cruzam a barreira intestinal. As células de Kupffer (células fagocíticas especializadas do sistema reticuloendotelial, encontradas na superfície luminal dos sinusóides hepáticos) são críticas para a rápida eliminação de microrganismos da circulação sistêmica e facilitam a geração de uma inflamação local capaz de recrutar diversas células como neutrófilos, monócitos e linfócitos. Além disso, hepatócitos são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em resposta a uma invasão bacteriana e/ou ativação por outras citocinas (CRISPE, 2009). Diversos estudos têm demonstrado que *B. abortus* apresenta um tropismo pelo sistema retículoendotelial e conseqüentemente podem ser encontradas no fígado (DELPINO et al., 2010). De fato, um dos importantes sintomas, característicos da Brucelose, é a hepatomegalia. Assim, uma vez que o fígado é um importante órgão que atua no combate a Brucelose, avaliamos se a resposta imune também estava modificada neste órgão após

o tratamento com Talidomida. Para isso, foram coletados fígados de animais tratados e infectados para determinação da concentração de citocinas no tecido hepático. Conforme mostrado na **figura 12**, foi possível detectar elevada produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α no tecido hepático em resposta à infecção com *B. abortus*. Entretanto, animais tratados com Talidomida produziram níveis significativamente maiores destas citocinas quando comparados a animais que não foram submetidos ao tratamento. Estes resultados demonstram que, assim como no baço, a Talidomida foi capaz de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias também no fígado.

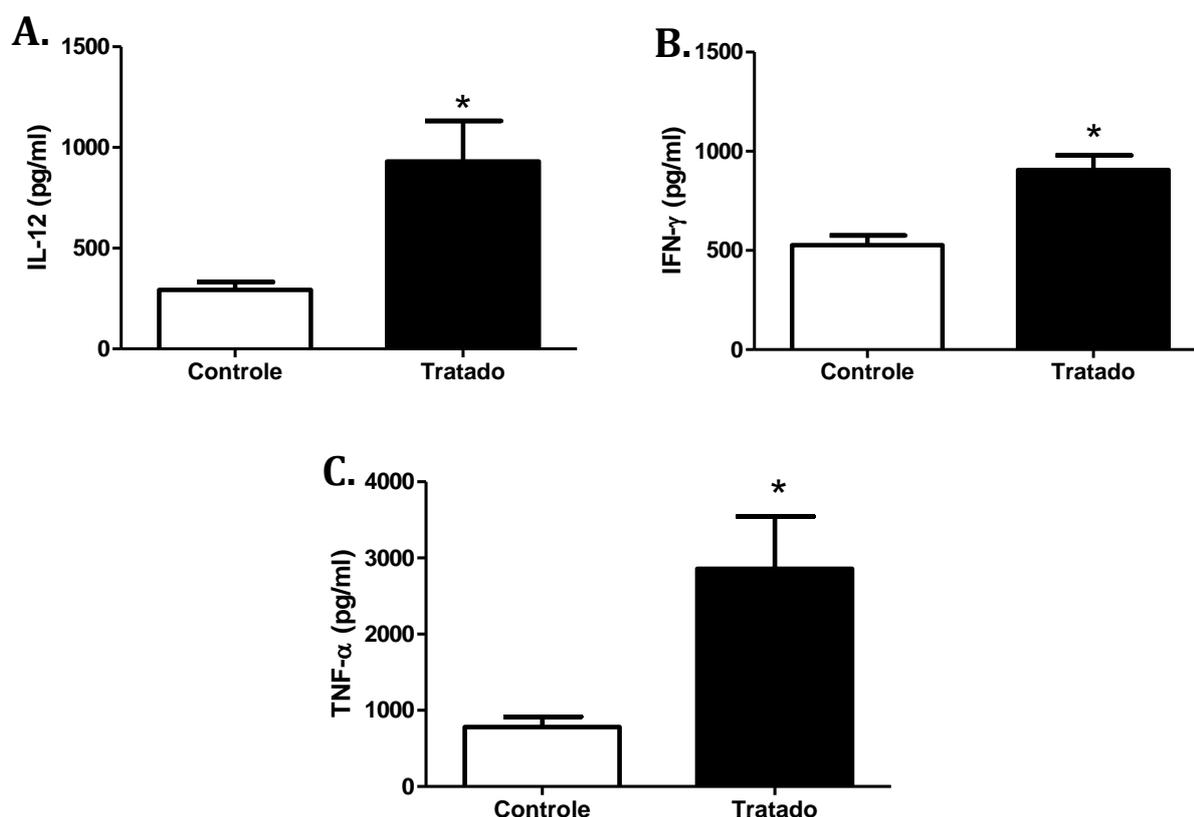


Figura 12: Talidomida aumenta a concentração de citocinas no tecido hepático.

Animais foram tratados com Talidomida (150mg/kg/dia) durante sete dias e infectados com a *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal). Após uma semana da infecção, o fígado foi retirado e macerado em solução de extração de citocinas. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para a detecção de IL-12, IFN- γ e TNF- α por Elisa. Como controles foram utilizados animais que não receberam tratamento com Talidomida. (*) significativo em relação aos animais do grupo controle. $p < 0,05$

5.7 Talidomida aumenta o número de linfócitos e diminui o número de neutrófilos e monócitos no baço de animais tratados e infectados por *B. abortus*.

Uma vez que a Talidomida é capaz de induzir proliferação celular, avaliamos se as alterações encontradas previamente estavam associadas a uma mudança no número de células. Para isso, o número de células presentes no baço de animais tratados ou não e infectados com *B. abortus* foram avaliadas utilizando-se um corante diferencial (Panótico rápido). Neste ensaio foram analisados o número de monócitos, neutrófilos e linfócitos.

A contagem do número de neutrófilos e macrófagos revelou uma discreta diminuição destes tipos celular em animais tratados, condizente com o caráter anti-inflamatório da Talidomida. Entretanto, a diferença encontrada nestes tipos celulares não foi significativa, provavelmente devido à existência de um elevado desvio padrão (**Figura 13**).

Entretanto, ao analisarmos a população de linfócitos foi possível perceber um aumento no número absoluto destas células em animais que receberam tratamento, quando comparados aos animais controles. Este aumento no número de linfócitos pode ser o responsável pela maior produção de citocinas e consequente aumento da resistência a *Brucella* encontrada nestes animais. Além disso, esses achados estão de acordo com estudos prévios que evidenciaram um aumento na proliferação de linfócitos concomitante a um aumento na produção de IFN- γ , em resposta ao tratamento com Talidomida (Haslett et al., 1998).

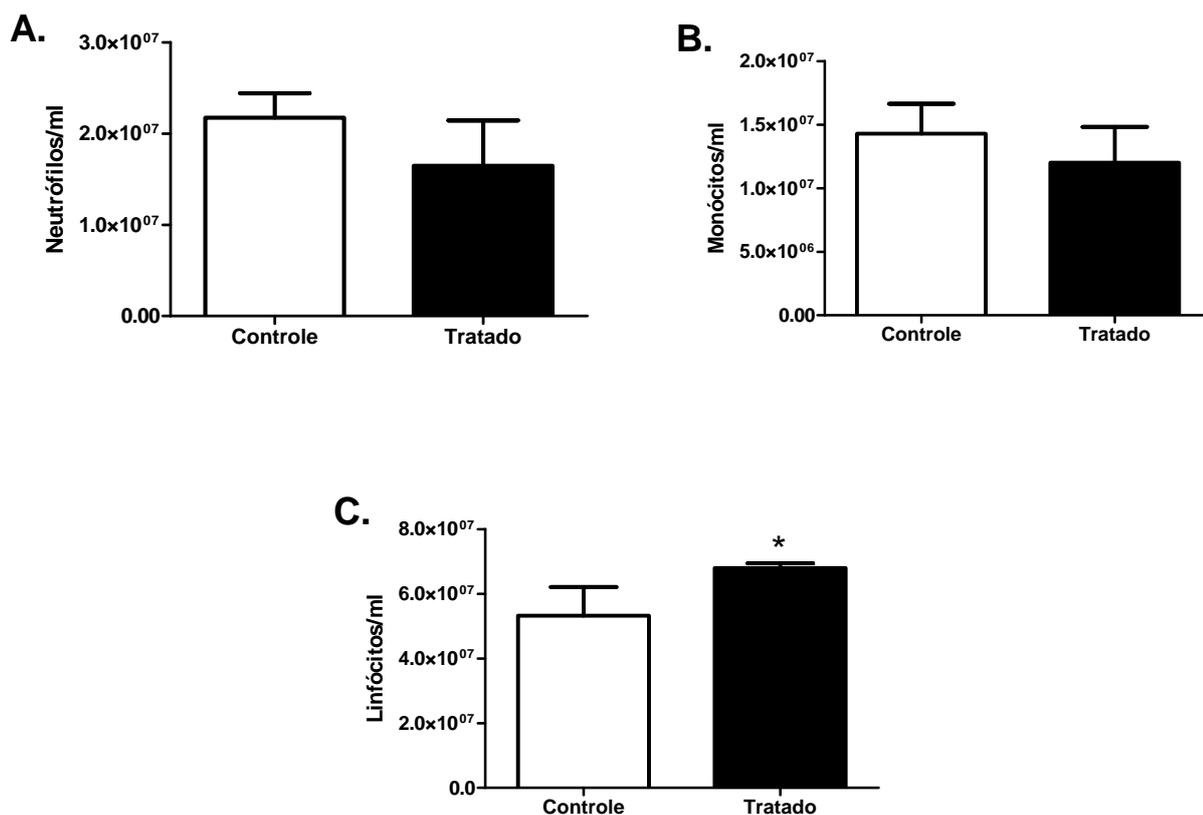


Figura 13: Talidomida aumenta o n3mero de linf3citos e diminui o n3mero de neutr3filos e mon3citos no baço de animais tratados e infectados por *B. abortus*. Animais foram tratados com Talidomida (150mg/kg/dia) durante sete dias e infectados com a *B. abortus* S2308 (10⁶bact/animal). Ap3s uma semana da infecç3o, c3lulas do baço foram retiradas, citocentrifugadas e coradas com corante diferencial (Pan3tico r3pido). As c3lulas foram observadas em microsc3pio 3tico, e classificadas e contadas de acordo com a morfologia e coloraç3o. (*) significativo em relaça3o aos animais do grupo controle(P<0,05)

5.8 Talidomida aumenta o percentual das c3lulas CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em animais tratados e infectados por *B. abortus*.

Conforme descrito previamente, a imunidade contra *B. abortus* envolve uma resposta de c3lulas TCD4⁺ voltada para o perfil T_H1, al3m de c3lulas T CD8⁺ citot3xicas (ARAYA; WINTER, 1990; GOLDING et al., 2001). Uma vez que encontramos um aumento no n3mero de linf3citos evidenciado pela contagem diferencial de c3lulas, avaliamos o perfil de c3lulas T presentes no baço de animais tratados com Talidomida e infectados com *B. abortus*. Para isso, animais foram tratados por 7 dias com Talidomida e infectados com *B. abortus*. Ap3s uma semana da infec-

ção, o baço foi retirado e as células foram marcadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 ou anti-CD3 e anti-CD8 e avaliadas por citometria de fluxo.

Os resultados (**Figura 14**) demonstraram que o baço de animais infectados com *B. abortus* (tratados ou não) apresenta maior percentual de células T CD8⁺ comparado ao percentual de células T CD4⁺, o que é condizente com uma resposta contra microrganismos intracelulares. Além disso, conforme esperado, foi percebido um aumento significativo no percentual de células T CD8⁺ em animais tratados com Talidomida (15,01%) quando comparado aos animais do grupo controle (11,07%). O mesmo não aconteceu com os linfócitos T CD4⁺ que apresentaram resultados semelhantes em ambos os grupos. Estes achados sugerem então que, como demonstrado em estudos anteriores (Haslett et al., 1998; Karrow et al. 2000; Haslett et al., 2003), a Talidomida induz aumento no número de linfócitos T CD8⁺ que, devido ao seu poder citotóxico, está potencializando a eliminação da *Brucella*, em conjunto com a maior produção de IFN- γ e de Óxido Nítrico.

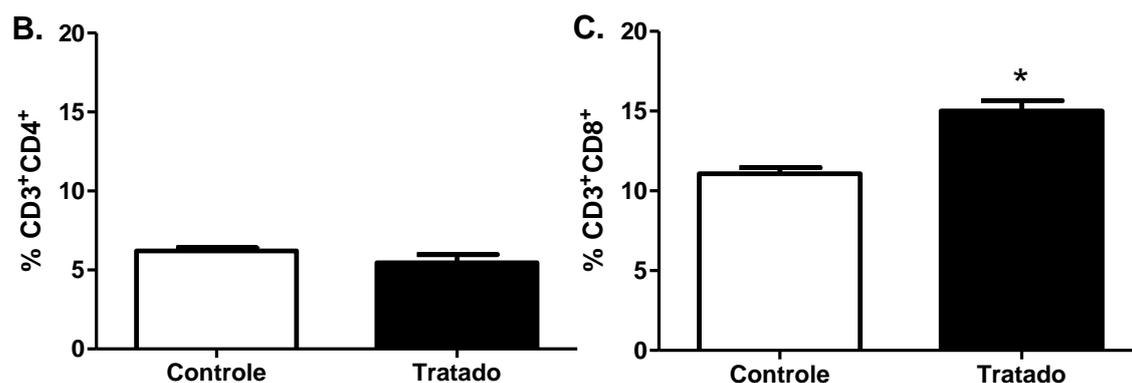
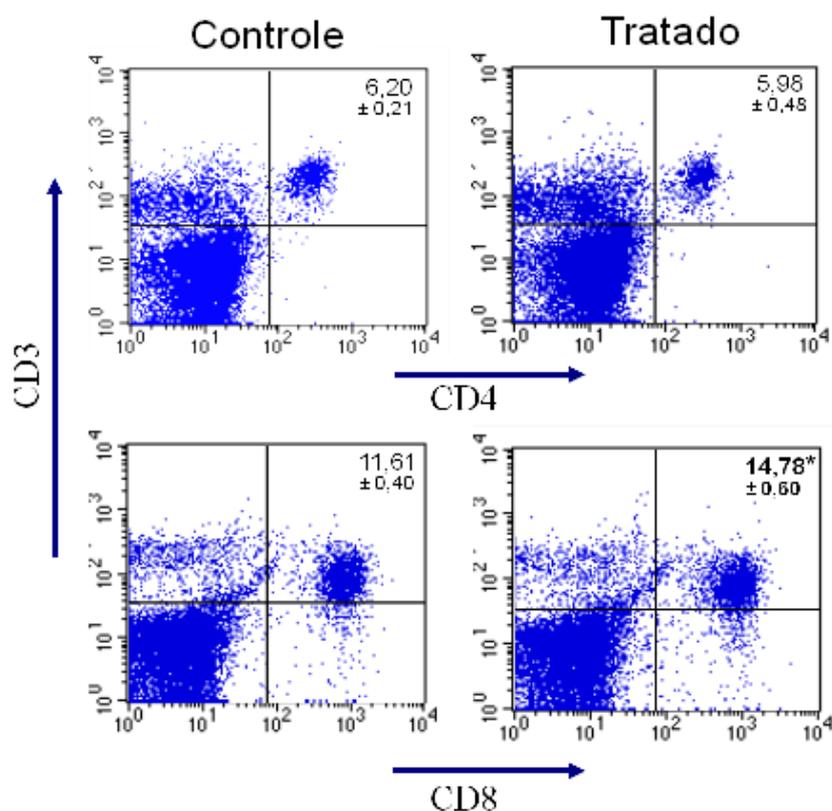


Figura 14 Talidomida aumenta o percentual das células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em animais tratados e infectados por *B. abortus*.

. Animais C57BL/6 foram tratados com Talidomida (150mg/Kg/dia) durante 7 dias e infectados com *B. abortus*. Após uma semana de infecção as células do baço foram extraídas lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 ou anti-CD3 e anti-CD8. (A) Imagem representativa de um experimento com 5 animais. (B e C) representação gráfica do percentual de células T CD3⁺CD4⁺ (B) e CD3⁺CD8⁺ (C). (*) p < 0.05, em relação ao grupo controle.

5.9 Talidomida aumenta a atividade citotóxica induzida por *B. abortus*

Diferentes estudos tem demonstrado que a Talidomida possui um caráter adjuvante sendo capaz de co-estimular células T induzindo sua proliferação, produção de citocinas (como o IFN- γ) e aumento da atividade citotóxica (no caso de Linfócito T CD8⁺) (HASLETT; CORRAL; ALBERT, 1998). Assim, uma vez que encontramos maior produção de IFN- γ por esplenócitos de animais tratados com Talidomida além de um aumento no número de linfócitos e, principalmente, aumento no percentual de células TCD8⁺ presentes no baço, avaliamos se a citotoxicidade medida por estas células também se encontrava alterada pelo tratamento. Para isso, macrófagos inflamatórios foram infectados com *B. abortus* e cultivados na presença de esplenócitos extraídos de animais infectados, tratados ou não com Talidomida. O nível de citotoxicidade foi determinado avaliando-se os níveis de LDH (lactato-desidrogenase) presentes no sobrenadante.

Conforme explicitado na **figura 15**, foi percebido a ocorrência de lise específica de macrófagos infectados em ambos os grupos avaliados (tratados e controles). Entretanto, esplenócitos derivados de animais tratados com Talidomida demonstraram maior habilidade para lisar células infectadas com *B. abortus* que células extraídas de animais que não receberam tratamento. Este resultado confirma então que um dos fatores responsáveis pela maior resistência à infecção por *B. abortus* encontrada em animais tratados com Talidomida é o aumento da citotoxicidade encontrada nestes animais.

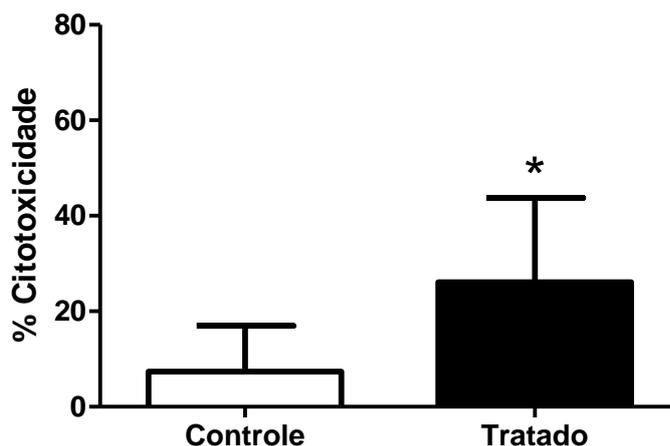


Figura 15: Talidomida aumenta a atividade citotóxica induzida por *B. abortus*

. Macrófagos peritoneais (5×10^5 células/poço) foram infectados com *B. abortus* (MOI 100:1) e usados como alvo celular. Como células efetoras foram utilizados esplenócitos obtidos de camundongos tratados por 7 dias com Talidomida (150mg/kg/dia) e com uma semana de infecção com *B. abortus*. Células efetoras foram co-cultivadas com as células alvo em duplicata na razão de 2:1 (efetor/alvo) por 24 horas. Como controle foram utilizados esplenócitos derivados de animais que não receberam tratamento com Talidomida. (*) significativo em relação aos animais não tratados. $p < 0,05$

6 DISCUSSÃO

Considerada uma zoonose amplamente difundida em todo mundo, a Brucelose, causada pela *B. abortus*, é uma grave doença, que representa uma importante causa mundial de morbidade. Além disso, a Brucelose animal está associada ao aborto e infertilidade resultando em sérias perdas econômicas em todo o mundo (GORVEL, 2008). Embora o tratamento da Brucelose seja eficiente, ainda não estão disponíveis vacinas eficazes para humanos. Além disso, as vacinas disponíveis para animais estão longe do ideal apresentando diversos problemas. Neste contexto uma droga que fosse capaz de potencializar o sistema imunológico de forma a melhorar a imunidade contra a *Brucella*, ou que fosse capaz de aumentar a eficácia das vacinas existentes, seria de grande valia.

No presente estudo, avaliamos o efeito do tratamento com Talidomida na resposta imune contra *B. abortus*. Esta droga foi escolhida uma vez que diversos trabalhos tem sugerido um caráter adjuvante, sendo capaz de co-estimular células T, induzindo proliferação celular, produção de citocinas e, principalmente, aumentando a atividade citotóxica dependente de linfócitos T CD8⁺. Além disso, foi demonstrada uma marcante indução do perfil T_H1 em células tratadas com Talidomida (DAVIES et al., 2001; HASLLET et al., 1998).

Primeiramente, avaliamos a concentração de Talidomida e a forma de tratamento capaz de influenciar no número de bactérias presentes no baço. Baseados nos estudos de Karrow e colaboradores (2000 e 2003) e Guo e colaboradores (2005), foram testadas as concentrações de 30, 50 e 150 mg/Kg/dia, utilizando um protocolo de tratamento de 7 ou 15 dias antes ou após a infecção. Foi escolhido um protocolo de tratamento diário uma vez que, *in vivo*, a Talidomida apresenta um tempo de meia vida curto. Através destes ensaios foi possível padronizar o tratamento prévio com 150 mg/Kg/dia, durante 7 dias, pelo fato de apresentar o mesmo resultado do tratamento com 15 dias em diminuir o número de bactérias no baço.

É interessante ressaltar que o tratamento posterior com Talidomida, na concentração de 150 mg/Kg/dia não foi capaz de alterar a carga bacteriana presen-

te no baço. Este fato nos leva a sugerir que a droga não é tóxica para o patógeno e conseqüentemente não age diretamente sobre o microrganismo.

Diferentemente de outros trabalhos, (GUO et al., 2005) nosso estudo somente encontrou diferença significativa utilizando uma dose relativamente elevada de Talidomida (150mg/Kg/dia). Este fato pode ser conseqüência da baixa solubilidade da droga em meio aquoso, que foi utilizado como veículo no tratamento (PBS). Apesar deste problema, optamos por fazer uma suspensão em PBS uma vez que a utilização de solventes orgânicos, como Dimetilsulfoxido (DMSO) ou Tween, poderia interferir nos resultados visto que possuem elevada toxicidade.

Após a padronização do protocolo de tratamento, a influência da Talidomida no combate a *Brucella* foi evidenciada pelo fato de que animais tratados apresentaram um número de bactérias no baço muito inferior aos animais não tratados, permanecendo assim durante todo o curso da infecção experimental (até 6 semanas). Essa diferença foi maior na primeira semana, onde o número de bactérias foi quase dez vezes menor nos animais que receberam tratamento (0,8 log) (**Figura 9**). Estes resultados são indícios de que a Talidomida pode ser capaz de modular a resposta imune de forma a aumentar sua eficiência e conseqüentemente limitar a infecção por *Brucella* de forma mais eficiente.

Visto que o tratamento com Talidomida diminuiu a susceptibilidade a infecção por *Brucella*, avaliamos então os mecanismos envolvidos neste processo. Vários trabalhos têm evidenciado que a resistência a patógenos intracelulares como a *Brucella abortus* depende da imunidade celular adquirida mediada por linfócitos T CD4⁺ polarizados para o perfil T_H1, além da citotoxicidade dependente de linfócitos T CD8⁺ e da produção de substâncias bactericidas (como o óxido nítrico), estimulada pelo IFN- γ (KO; SPLITTER, 2003; OLIVEIRA; SPLITTER, 1995; JONES; WINTER, 1992;). Assim, avaliamos se o tratamento com Talidomida modifica de alguma forma, estes componentes da resposta imune. Para isso, células extraídas de animais tratados e infectados com a *Brucella* foram cultivadas e os níveis da citocina IFN- γ e de Óxido Nítrico foram mensurados. Paralelamente ao aumento da resistência encontrada em animais tratados, a produção de IFN- γ e NO foi aumentada nestes animais (**Figura 10 e 11**), demonstrando que a Talidomida, pode ser capaz de interferir na síntese destes mediadores produzidos em resposta a infecção.

Estes achados estão de acordo com estudos anteriores de Haslett e colaboradores (1998) que também evidenciaram uma maior produção de IFN- γ em linfócitos tratados com Talidomida. Neste estudo, tanto linfócitos TCD4⁺ como TCD8⁺ produziram quantidades maiores de IFN- γ quando expostos a Talidomida.

A produção de citocinas também foi avaliada no fígado uma vez que estudos têm demonstrado que *B. abortus* também pode ser encontrada neste órgão, apresentando tropismo pelo sistema retículoendotelial e induzindo hepatomegalia (DELPINO et al., 2010). Além disso, a grande função metabólica do fígado sugere que a Talidomida e seus metabolitos poderiam estar presentes em maiores concentrações neste órgão. Em conformidade com a menor carga bacteriana, animais tratados com Talidomida também exibiram maior produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ neste órgão. Como já mencionado, no contexto da resposta imune contra *Brucella*, a IL-12 é de grande importância uma vez que atua sobre os linfócitos T induzindo-os a se diferenciar para o fenótipo T_H1. Estas células, assim diferenciadas, são grandes produtoras de IFN- γ , que potencializa as atividades bactericidas dos fagócitos (ABBAS et al., 2012., CHEERS et al., 1996). Já o TNF- α tem a função de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio da infecção além de ativar essas células na tentativa de erradicar o microorganismo invasor (ABBAS et al., 2012). Além disso, estudos anteriores têm mostrado que TNF- α pode atuar de maneira autócrina, aumentando a produção de IL-12 e conseqüentemente de IFN- γ (ZHAN; CHEERS, 1998). Assim, o aumento na produção destes mediadores imunológicos nos animais tratados com Talidomida, está diretamente relacionado a destruição da bactéria e conseqüente aumento da resistência do hospedeiro.

Estudos focando a atividade antiinflamatória da Talidomida tem demonstrado que esta droga é capaz de inibir a produção de TNF- α por células da imunidade inata, tanto *in vitro* como *in vivo* (DENG et al., 2003; SAMPAIO et al., 1993; SAMPAIO et al., 1991). Além disso, resultados conflitantes têm sido encontrados com relação a produção de IL-12, onde a droga se mostra inibitória e alguns casos e estimulatória em outros (MOLLER et al., 1997; CORRAL; KAPLAN, 1999). Apesar disso, há um consenso de que a Talidomida exerce um efeito co-estimulatório em respostas dependentes de células T. Assim acreditamos que a maior produção de TNF- α encontrada no fígado de animais tratados com Talidomida seja primariamente

te proveniente de células T e, juntamente com o IFN- γ , induzam outras células (como monócitos e células dendríticas) a produzirem quantidades maiores de IL-12. Apesar disso, outros experimentos são necessários para confirmar esta hipótese.

Uma interessante propriedade da Talidomida é a indução de proliferação celular. Haslett et al (1998) demonstraram que esta droga é capaz de agir sobre linfócitos estimulando sua proliferação de forma dependente de IL-2. Assim, uma vez que encontramos maior produção de citocinas por células provenientes de animais tratados com Talidomida, avaliamos a existência de aumento no número absoluto de linfócitos, monócitos e neutrófilos. Como esperado, e em concordância com o trabalho citado, a contagem diferencial demonstrou um significativo aumento do número de linfócitos em animais tratados, quando comparados aos animais que não receberam tratamento, o que pode estar relacionado ao poder co-estimulatório e proliferativo do fármaco.

De maneira interessante, não foram detectadas mudanças significativas no número de monócitos e neutrófilos, havendo inclusive uma pequena diminuição no número destas células. Estes achados contrastam com os trabalhos de Guo e colaboradores (2005) que encontraram um significativo aumento no número de neutrófilos no baço e fígado após tratamento com Talidomida. Análises mais apuradas são necessárias para esclarecer essas discrepâncias porém, as diferenças no modelo de infecção (*Brucella* e *Listeria*) e nos protocolos de tratamento poderiam justificar esta contradição.

O conhecimento de que uma resposta imune efetiva contra *Brucella* envolve tanto linfócitos T CD4⁺ quanto células T CD8⁺ citotóxicas (GOLDING et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1995; ARRAYA & WINTER, 1990;), juntamente com o aumento no número de linfócitos encontrado no baço de animais tratados, nos levou a avaliar o perfil de células T presentes no baço de animais tratados e infectados. Conforme esperado, foi encontrado um significativo aumento no percentual de células T CD8⁺ em animais tratados, enquanto nenhuma diferença foi percebida nas células T CD4⁺. Haslett e colaboradores (1998), utilizando linhagens purificadas de células T CD4⁺ e CD8⁺ humanas, já haviam demonstrado que a Talidomida é capaz de induzir maior proliferação celular em linfócitos T CD8⁺. Entretanto, estes autores não

perceberam ação da droga em populações celulares mistas, diferente do que foi observado no presente estudo. Apesar disso, outros estudos, do mesmo grupo (Haslett et al., 1997) demonstraram um aumento no número de linfócitos TCD8⁺ circulantes em pacientes infectados com HIV e tratados com Talidomida, demonstrando que o fármaco pode sim ter ação *in vivo*.

Em modelo murino, estudos mais recentes de Karrow e colaboradores (2000) também evidenciaram a capacidade da Talidomida de estimular linfócitos T CD8⁺. Utilizando camundongos B6C3F1 tratados com Talidomida por 28 dias, estes autores encontraram um aumento no número absoluto destas células no baço em conjunto com o aumento da resposta humoral e diminuição das células NK.

Por fim, uma vez que nossos resultados apontam para os linfócitos T CD8⁺ como os grandes efetores do aumento na resistência à infecção por *Brucella*, avaliemos se a citotoxicidade também estava modificada pelo tratamento com Talidomida. De fato, em concordância com o aumento no número de linfócitos T CD8⁺ e com a menor carga bacteriana encontrada em animais tratados, foi detectado um aumento no potencial citotóxico de esplenócitos oriundos de animais que receberam Talidomida. Esses resultados demonstram que a Talidomida também estimula a resposta citotóxica e está de acordo com diversos trabalhos que também evidenciaram aumento da atividade citotóxica após tratamento com Talidomida (HASLETT et al., 2001; KARROW et al. 2000; HASLETT et al., 1998). Além disso, o aumento da citotoxicidade sobre macrófagos infectados com *Brucella* nos leva a sugerir que a co-estimulação executada pela Talidomida foi antígeno-específica.

É importante comentar que células NK também apresentam atividade citotóxica além de fazer parte da resposta imune contra *Brucella* (BIRON, 1999). Embora não tenhamos avaliado este tipo celular, acreditamos que o aumento da atividade citotóxica induzido pela Talidomida não seja influenciado por estas células. Esta hipótese se baseia em estudos anteriores que demonstraram que a Talidomida não altera (ZWINGENBERGER; WNEDT, 1996) ou ainda diminui o número de células NK (KARROW et al., 2000) presentes.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que análogos da Talidomida poderiam ser utilizados como potentes adjuvantes, capazes de induzir a proliferação de linfócitos TCD8⁺, aumentar o potencial citotóxico e estimular a pro-

dução de citocinas pro-inflamatórias, mecanismos importantes no combate a infecções por patógenos intracelulares como a *Brucella*. A conhecida teratogenicidade e neurotoxicidade apresentada pela Talidomida em conjunto com sua curta meia vida impõem sérias restrições ao seu uso em humanos.

A exposição à Talidomida durante as primeiras 3 a 6 semanas após a concepção resultou em múltiplas deformações fetais durante o início de 1960 (FRANKS et al., 2004). Defeitos como malformações nos membros, orelhas, olhos, órgãos internos e sistema nervoso central foram relatados (MILLER; STROMLAND, 1999). Além do mais, a taxa de mortalidade de recém-nascidos devido a malformações congênitas foi alta (30-40%), além do número desconhecido de abortos (VARGESSON, 2009).

Análogos da Talidomida foram recentemente criados para otimizar algumas propriedades dessa droga incluindo propriedades anticâncer, enquanto ao mesmo tempo eliminam ou reduzem a toxicidade associada a Talidomida. O análogo CC-5013 apresenta potência aumentada na resposta antígeno-específica das células T CD8⁺ em relação à Talidomida, além de aumentar a imunidade protetora anti-tumor quando administrado em camundongos na primeira fase de imunização celular (DREDGE et al., 2002).

Desse modo, o futuro desta classe de compostos está nos análogos da Talidomida, principalmente a Lenalidomida. Eles apresentam potência imunomodulatória e anti-angiogênica significativamente aumentada e aparentemente são ausentes dos efeitos colaterais da Talidomida, tornando-os importantes alvos terapêuticos para o câncer. Ademais, a Lenalidomida não é teratogênica em coelhos, espécies sensíveis para as deformações fetais causadas pela Talidomida, podendo ser uma futura opção terapêutica (TEO, 2003).

Neste contexto, o desenvolvimento de análogos desta droga que consigam manter suas habilidades co-estimulatórias mas subvertam suas ações tóxicas seria extremamente desejável. Assim, nosso estudo ganha importância uma vez que sugere, de forma fundamentada, a utilização de análogos da Talidomida como novos compostos capazes de melhorar a resposta imune contra patógenos intracelulares.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com esse trabalho nos permitem concluir que o tratamento com Talidomida é capaz de alterar a resposta imune do hospedeiro de forma a favorecer a eliminação do patógeno.

Além disso, estes resultados nos permitem propor o seguinte quadro: o tratamento com Talidomida estimula uma maior proliferação de linfócitos, principalmente linfócitos T CD8⁺. Este aumento no número de linfócitos em conjunto com outras ações da droga, levam a um aumento da produção de citocinas (IFN- γ e TNF- α) e na atividade citotóxica. A maior concentração de IFN- γ e TNF- α induzem um aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos que, juntamente com a atividade citotóxica, culminam com a maior eliminação do patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e molecular**. 7. ed. Elsevier Editora Ltda. 2012.

ACHA, N.P., Szyfres, B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. **Pan American Health Organization**, Washington, v. 1, n. 3, 2003.

ALP, E. et al. Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 72, 2006.

ALTON, G. G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. **Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, 1988.

ARELLANO-REYNOSO, B. et al. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. **Nature Immunology**, v. 6, p. 618–625, 2005.

ARIZA J. Brucellosis: an update. The perspective from the Mediterranean basin. **Journal of Medical Microbiology**, v.10, p.125–135, 1999.

BALDWIN, C. L.; WINTER, A. J. Macrophages and *Brucella*. **Immunology Series**, p.360-363, 1994.

BALDWIN, C. L., Goenka, R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? **Critical Reviews in Immunology**, v. 26, p. 407-442, 2006.

BARTLETT, J. B.; DREDGE, K; DALGLEISH, A.G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 314–322, 2004.

BAUMGARTEN, D. Brucellosis: A short review of the disease situation in Paraguay. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.63-69, 2002.

BILLARD, E.; DORNARD, J.; GROSS, A. *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. **Infection Immunity**, v. 75, p. 4980–4989, 2007.

BILLARD, E.; DORNAND, J.; GROSS, A. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. **Infection Immunity**, v. 75, p. 5916-5923, 2007.

BIRON C.A. Initial and innate responses to viral infections—pattern setting in immunity or disease, **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p. 374–381, 1999.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon- γ . **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749, 1997.

BORGES, L. G.; FROEHLICH, P. E. Talidomida- Novas perspectivas para a utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 96-102, 2003.

BRANDÃO, A. P. M. S. et al. Host Susceptibility to *Brucella abortus* Infection Is More Pronounced in IFN- γ knockout than IL-12/ β 2-Microglobulin Double-Deficient Mice. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília, p. 525-602, 1977.

BRASIL. Ministério da Pecuária Agricultura e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. Brasília, 2006. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br>). Acesso em: 2 de março de 2012.

BRAZIL, Ministério da Agricultura. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, v. 1–4, p. 17, 1971.

CAMPOS, M. A. et al. Role of Toll-Like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 176-186, 2004.

CARDOSO, P. G. et al. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 13, 2006.

CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. **Animal Brucellosis**, p.335-350, 1990.

CELLI, J. et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p. 545–556, 2003.

CHEERS, C.; HO, M. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. **Journal of Reticuloendothelial Society**, v. 34, n. 4, p. 299-309, out. 1983 .

CHEYMOL, J.; The Thalidomide Drama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 11, p. 123, 1965.

CLOECKAERT, A. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. **Vaccine**, v. 20, p. 1820–1822, 2002.

COLMENERO, J. D.. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. **Medicine**, v.75, p.195–211, 1996.

COPIN, R. et al. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. **Journal of Immunology**, v.178, n. 8, p. 5182–5191, abr. 2007.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 213-221, 1997.

CORRAL, L.; KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, n. 1, p. 1107–1113, 1999.

CRASTA, O. et al. Genome Sequence of *Brucella abortus* Vaccine Strain S19 Compared to Virulent Strains Yields Candidate Virulence Genes. **Plos One**, Virgínia, v. 3, n. 5, mai. 2008.

CRAWFORD, R.P., HUBER, J.D., ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.). **Animal Brucellosis**. CRC Press, Boca Raton, USA, 1990, p. 131–151.

CRISPE, I. N. The Liver as a Lymphoid Organ. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 147-163, 2009.

D'AMATO R. J et al.. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 4082–4085, 1994.

DAVIES, F. E. et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. **Blood Journal Hematology**, Boston, v. 98, n. 1, p. 210-216, 2001.

DELPINO, M. V. et al. *Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses. **Journal of Hepatology**, v. 53, n.1, p. 145-154, abr. 2010.

DELVECCHIO, V. G. et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 99, p. 443–448, 2002.

DREDGE, K. et al. Protective antitumor immunity induced by a costimulatory thalidomide analog in conjunction with whole tumor cell vaccination is mediated by increased Th1-type immunity. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 4914–4919, 2002.

ERIKSSON, T. et al. Enantiomers of thalidomide: Blood distribution and the influence of serum albumin on chiral inversion and hydrolysis. **Chirality**, v. 10, p. 223-228, 1998.

ERIKSSON, T. et al. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: Pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 807-817, 2000.

ERSOY, Y. et al. Comparison of three different combination therapies in the treatment of human brucellosis. **Tropical Doctor**, v. 35, p. 210–212, 2005.

ETER, N. DMSO mimics inhibitory effect of thalidomide on choriocapillary endothelial cell proliferation in culture. **The British Journal Ophthalmology**, Bonn, v. 86, p. 1303-1305, 2002.

EWALT, D.R. et al. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, p. 417–420, 1997.

FALAGAS, M.E., BLIZIOTS, I.A. Quinolones for treatment of human brucellosis: critical review of the evidence from microbiological and clinical studies. **Antimicrobiology Agents Chemotherapy**, v. 50, p. 22–33, 2006.

FERNANDES, D.M.; BALDWIN, C.L. IL-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. **Infection Immunity**, v. 63, p. 1130-1133, 1995.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2688–2693, 2007.

FRANKS, M. E; MACPHERSON, G. R. FIGG, W. D. Thalidomide. **Lancet**, v. 363, p. 1802–1811, 2004.

FRETIN, D. et al. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 687–698, 2005.

GEITZ, H; HANDT, S; ZWINGENBERGER, K. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. **Immunopharmacology**, v. 31, p. 213-221, 1996.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Croatian Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 296-305, ago. 2010.

GOLDING, B. et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection**, Rockville, v. 3, p. 43-48, 2001.

GLYNN, M.K., LYNN, T.V. Brucellosis. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 233, p. 900–908, 2008.

GORVEL, J. P. *Brucella*: a Mr “Hide” converted into Dr Jekyll. **Microbes Infection**, v. 10, p. 1010–1013, 2008.

GROSS, A. et al. Impairment of *Brucella* growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 75-82, 2004.

GUO, T. L. et al. Thalidomide enhances both primary and secondary host resistances to *Listeria monocytogenes* infection by a neutrophil-related mechanism in female B6C3F1 mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 209, p. 244-254, 2005.

HALLING, S.M. et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, Olsen, v. 187, p. 2715–2726, 2005.

HAMDY, M. E., AMIN, A.S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **Veterinary Journal**, v. 163, p. 299–305, 2002.

HARTIGAN, P. J. Human brucellosis epidemiology and clinical manifestations. **Irish Veterinary Journal**, n. 3, v. 50, p. 179-180, 1997.

HASLETT, P.; CORRAL, L.; ALBERT, M. Thalidomide Costimulates Primary Human T Lymphocytes, Preferentially Inducing Proliferation, Cytokine Production, and Cytotoxic Responses in the CD8⁺ Subset. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 187, n. 11, p. 1885–1892, jun. 1998.

HASLETT, P. A; et al. Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 15, p. 1169-1179, 1999.

HASLETT, P. et al. The metabolic and immunologic effects of short-term thalidomide treatment of patients infected with the human immunodeficiency virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.13, p. 1047-1054, 1997.

HIDESHIMA T. et al. Thalidomide and its analog overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional. **Therapy Blood**,v. 96, p. 2943-2950, 2000.

HUANG, L. Y. et al. Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1441–1446, ago. 2003.

HUANG, L. Y. et al. IL-12 induction by a TH1- inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 3, p. 1423–30, ago. 2001.

HUANG, L.Y. et al. T_H1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3964-3970, 2005.

ITO, T. et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. **Science**, v. 327, p. 1345–1350, 2010.

JANEWAY, C.A. The T-cell receptor as multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T-cell activation. **Annual Review of Immunology**, v.10, p. 645–674, 1992.

JIANG, X., BALDWIN, C.L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, n. 61, p. 124–134, 1993.

JONES, S.M.; WINTER, A.J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, n. 60, p. 3011–3014, 1992.

KAHLER, S.C. *Brucella melitensis* infection discovered in cattle for first time, goats also infected. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 216, p. 648, 2000.

KARROW, N. A. et al. Thalidomide modulation of the immune response in female B6C3F1 mice: a host resistance study. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1447-1456, 2003.

KHAN, M.Y.; MAH, M.W.; MEMISH, Z.A.. Brucellosis in pregnant women. **Clinical Infection Diseases**, v. 32, p. 1172–1177, 2001.

KO, J.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; SPLITTER, G.A. Susceptibility of IFN Regulatory Factor-1 and consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. **Journal of Immunology**, v.168, p. 2433–2440, 2003.

LENZ, W. Thalidomide and congenital abnormalities. **Lancet**, v. 2, p. 45, 1962.

LILENBAUM, W. S. et al. A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro. **Brazilian Veterinay Journal**, v. 173, p. 408–412, 2007.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O RENASCIMENTO DE UM FÁRMACO: TALIDOMIDA. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 5, p. 683-688, set./dez. 2001.

LUNA-MARTINEZ, J.E.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: Current status and trends. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.19-30, 2002.

MACEDO, G.C. et al. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **Journal of Immunology**, v.180, n. 2, p. 1080–1087, 2008.

MANTUR, B.G.; AMARNATH, S.K.; SHINDE, R.S.. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 25, p. 188–202, 2007.

MARTÍNEZ, T. G.; MORIYÓN, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. **Journal Bacteriology**, v.175, p. 5273–5275, 1993.

MCBRIDE, W. G.; **Lancet**, v. 1, p. 1358, 1961.

MILLER, M.T.; STROMLAND, K. Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. **Teratology**, v. 60, p. 306–321, 1999.

MITSIADES, N. et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. **Blood**, v. 99, p. 4525-4530, 2002.

MOLLER, D.R. et al. Inhibition of IL-12 production by thalidomide. **Journal of Immunology**, v. 159, p. 5157–5161, 1997.

MOREIRA, A. L. et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1675-1680, 1993.

MONREAL, D. et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3261-3271, 2003.

MORENO, E. Brucellosis in Central America. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.31-38, 2002.

MORENO, E.; GORVEL, J. P. Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. In: Horizon Bioscience ed. *Brucella*. **Molecular and Cellular Biology**, United Kingdom, p.287–312, 2004.

MURPHY, E. A., et al. Interferon- γ is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. **Immunology**, vol. 103, n. 4, p. 511–518, 2001.

MORIYON, I. et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. **Veterinary Research**, v. 35, p. 1–38, 2004.

MURPHY, E. A. et al. Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 32, p. 85–88, 2001.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2417–2423, 1997.

NOMAN, A. S. M. et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production via down-regulation of MyD88 expression. **Innate Immunity**, Aichi, v. 15, n. 1, p. 33-41, jul.-out. 2009.

OLIVEIRA, S.C., et al. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 77–84, 1998.

OLIVEIRA, S.C.; SPLITTER, G.A. 1995. CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45Rb^{lo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 2551–2557, 1995.

OLIVEIRA, G.G. A indústria farmacêutica e o controle internacional de medicamentos. **Editores Gráficos do Senado**, Brasília, 1998.

PACHECO, G.; MELLO, M. T. **Brucelose**. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1956. 727p.

PARMAN, T.; WILEY, M. J; WELLS, P.G. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. **Nature Medicine**, v. 5, p. 582–585, 1999.

PAULSEN I.T. et al., The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. **Proceedings National Academy Sciences**, v. 99, p. 13148–13153, 2002.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. Challenges in *Brucella* bacteremia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, Suppl. 1, p. 29–31, 2007.

PAPPAS, G., et al. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 91-99, 2006.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, v. 10, n. 2, 2003.

PIZARRO-CERDÁ, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. **Infectious Immunity**, v. 66, p. 5711–5724, 1998.

PORTE, F.; LIAUTARD, J. P, KOHLER, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. **Infection Immunity**, v. 67, p. 4041–4047, 1999.

POWELL, R. New Roles for Thalidomide. **British Medical Journal**, v. 313, p. 313-377, 1996.

RAJE, N.; ANDERSON, K. Thalidomide: A revival story. **New England Journal Medicine**, v. 341, 1999.

REGUERA, J. M. et al. *Brucella* endocarditis: clinical, diagnostic, and therapeutic approach. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**, v. 22, p. 647–650, 2003.

SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, p. 55–63, 1996.

SAMPAIO, E. P. et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor production by stimulated human monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 699-703, 1991.

SAMPAIO, E. P. et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 408-414, 1993.

SANGARI, F. J.; AGUERO, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. **Microbiología**, v. 12, n. 2, p. 207-218, jun, 1996.

SCHURIG, G. G. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, n. 28, p. 171-188, 1991.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.58, p. 375–382, 2008.

SELEEM, M.N. et al. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, p. 24–31, 2009.

SKENDROS, et al. Cell-mediated immunity in human brucellosis. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 134-142, 2011.

SOLERA, J., MARTINEZ-ALFARO, E., ESPINOSA, A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. **Drugs**, v. 53, p. 245–256, 1997.

SPLITTER, G. et al. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 54, p. 309, 1996.

SRIRANGANATHAN, N. et al. Genome mapping and genomics in animal-associated microbes. In: *Brucella*. **Springer**, Chapter 1, 2009.

STEVENS, M. G. et al. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 32, p. 1065-1066, 1994.

STUEHR, D. J.; MARIETTA, M. A. Induction of nitrite/ nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-g. **Journal of Immunology**, v. 139, p. 518-525, 1987.

THERAPONOTOS, C. et al. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 8573–8578, 2009.

TSOLIS, R.M. Comparative genome analysis of the alpha -proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.20, p.12503-12505, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.212508599>>. Acesso em: 12 mai 2009. doi:10.1073/pnas.212508599.

UGALDE, J. E. et al. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6264-6269, 2003.

VEMULAPALLI, R. et al. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3927-3932, 2000.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-yearold puzzle. **Bioessays**, v.31, p. 1327–1336, 2009.

VERGER, J. M. et al. Taxonomy of the genus *Brucella*. **Annales de Institut Pasteur Microbiology**, v. 138, 235–238, 1987.

ZWINGENBERGER, K.; WNENDT, S. Immunomodulation by thalidomide: Systematic review of the literature and of unpublished observations. **Journal of Inflammation**, v. 46, p. 177–211, 1996.

ZHAN, Y.F.; STANLEY, E.R., CHEERS, C. Prophylaxis or treatment of experimental brucellosis with interleukin-1. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 1790–1794, 1991.

ZHAN, Y.; YANG, J.L.; CHEERS, C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 2841–2847, 1993.

WANG, M. et al. High levels of Nitric Oxide Production Decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, n. 5, p. 221-230, nov. 2001.

WANKE, M.M. Canine brucellosis. **Animal Reproduction Society**, v. 82, p. 195–207, 2004.

WEISS, D. S. et al. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. **Infection Immunity**, v. 73, p. 5137–5143, 2005.

WOODARS, L. F. Do we need another brucellosis vaccine? **Modern Veterinary Practice**, n. 62, p. 857-859, 1981.

WYATT, H.V. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 98, p. 451–454, 2005.

WYCKOFF, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 395–415, 2002.

YOUNG, E. J. An overview of human brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 283–290, 1995.

YINGST, S.; HOOVER, D.L. T cell immunity to brucellosis, **Critical Reviews in Microbiology**, v. 29, p. 313-331, 2003.

