

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IMUNIDADE INATA, PATOGÊNESE E DIAGNÓSTICO DE
SALMONELOSE, BRUCELOSE E LEISHMANIOSE

RENATO DE LIMA SANTOS

Texto sistematizado apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, para o concurso de Livre-Docência junto ao Departamento de Clínica Veterinária.

Botucatu – SP

Fevereiro / 2011

NOTA PRELIMINAR

Este trabalho foi elaborado visando ao atendimento da Resolução UNESP – 27, de 15 de abril de 2009. Trata-se de uma análise sistemática de parte da produção científica do autor, gerada durante e após seu doutoramento, buscando contextualizar tal produção, com ênfase em sua contribuição para o avanço das áreas de conhecimento envolvidas.

Cabe salientar que, para garantia da mais absoluta fidelidade dos dados apresentados neste texto, não foram incluídos resumos ou trabalhos apresentados em eventos científicos, tendo sido incluídos apenas trabalhos publicados em periódicos com avaliação por conselho editorial e por pares. Eventualmente, foram utilizados capítulos de livros ou livros-texto produzidos pelo autor.

O texto é acompanhado das separatas dos trabalhos publicados que deram suporte a análise apresentada, de forma que toda a informação original esteja disponível aos leitores, sem que o texto se tornasse excessivamente longo e enfadonho.

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial à memória de minha mãe, Rute, e ao meu filho Daniel, que permanentemente trazem luz ao meu caminho.

Aos meus alunos, pois não há nada mais gratificante do que o privilégio de influenciar, ainda que modestamente, na formação de alguns indivíduos cujo potencial se aproxima do infinito.

AGRADECIMENTOS

Tenho por obrigação a oferecer primeiramente meus agradecimentos aos meus alunos. Se há mérito, pertence a eles.

Agradeço efusivamente a todos os colaboradores que viabilizaram a realização dos projetos cujos resultados são apresentados neste trabalho. Antecipando as desculpas por qualquer injustiça por não listar todos, injustiça maior seria não reconhecer aqui a dileta parceria que desenvolvemos com os colegas Renée Tsolis e Andreas Baumler, ambos da *Univesity of California*. Também cabe especial reconhecimento à contribuição da Profa. Tatiane Alves da Paixão e da Dra. Érica Azevedo Costa, pela lealdade e comprometimento no exercício da investigação científica.

Agradeço meus orientadores que tiveram papel determinante em minha trajetória científica, iniciando com a atenção dispensada pela Profa. Vera Alvarenga Nunes que me guiou em meus primeiros passos durante a iniciação científica. Mais tarde foi o Prof. Antonio de Pinho Marques Júnior que orientou minha tese de mestrado. Agradeço também o meu caro Prof. Garry Adams, da *Texas A&M University*, que serviu como orientador, com dedicação e empenho, durante meu doutorado, além de ser exemplo incontestável de retidão profissional e de caráter.

Temos tido o privilégio de conviver e sermos auxiliados por nossa bolsista de apoio técnico, Adriana Amantino, que nos proporciona condições para trabalhar, sem parar de sonhar.

Registro aqui minha gratidão eterna e incondicional à Universidade Federal de Minas Gerais, minha casa.

Finalmente, expresso gratidão às agências de fomento que têm nos proporcionado condições para, ainda que muito humildemente, contribuirmos com a construção do conhecimento. Temos tido apoio constante do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), além de instituições internacionais incluindo-se a *John Simon Guggenheim Memorial Foundation* (EUA), a *International Foundation for Science* (IFS, Suécia), a *Waltham Foundation* (Reino Unido) e o *United States Department of Agriculture* (USDA, EUA).

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO 2. IMUNIDADE INATA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	28
2.1. Salmonelose	28
2.2. Mecanismos moleculares de patogênese de <i>Salmonella enterica</i>	29
2.3. Modelos animais em salmonelose	34
2.4. Modelos de co-infecção	40
2.5. Síntese da contribuição na área de salmonelose	44
CAPÍTULO 3. IMUNIDADE INATA, PATOGÊNESE E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>BRUCELLA SP.</i>	51
3.1. Brucelose	51
3.2. Interação patógeno-hospedeiro: patogênese e imunidade inata	59
3.3. Diagnóstico da brucelose	67

3.4. Síntese da contribuição na área de brucelose	68
 CAPÍTULO 4. LESÕES GENITAIS E TRANSMISSÃO VENÉREA DE <i>LEISHMANIA CHAGASI</i>	 75
4.1. Leishmaniose	75
4.2. Lesões genitais e feto placentárias e transmissão venérea da leishmaniose visceral canina	79
4.3. Síntese da contribuição na área de leishmaniose	84
 CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	 89
 REFERÊNCIAS	 93
 ANEXOS	 123

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BOPI-1	<i>B. ovis-pathogenicity island 1</i>
CD4	<i>cluster differentiation 4</i>
cDNA	DNA complementar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CXCL6	(C-X-C motif) ligante 6
CXCL8	(C-X-C motif) ligante 8
DNA	ácido desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
GCP-2	<i>granulocyte chemotactic peptide-2 / granulocyte chemoattractant protein-2</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	interferon gama
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-8	interleucina
IL-17	interleucina 17
IL-18	interleucina 18
IL-23	interleucina 23
iNOS	óxido nítrico sintetase indutível
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial

IRF-1	interferon regulatory factor 1
kDNA	DNA do kinetoplasto
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LPS	lipopolissacarídeo
LV	leishmaniose visceral
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOD	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
Nramp1	<i>natural resistance associated macrophage protein 1</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMCA	<i>plasma membrane calcium-transporting ATPase</i>
RER	retículo endoplasmático rugoso
RT-PCR	<i>reverse transcription – polymerase chain reaction</i>
SIV	vírus da imunodeficiência símia
Slc11a1	<i>solute carrier family 11 member 1</i>
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
SST3	sistema de secreção do tipo III
SST4	sistema de secreção do tipo IV
UFC	unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

Imunidade inata, patogênese e diagnóstico de salmonelose, brucelose e leishmaniose – Renato de Lima Santos

Este trabalho traz uma revisão sistemática e crítica de parte da produção científica de seu autor. O trabalho incluiu três linhas de pesquisa, incluindo a salmonelose, brucelose e leishmaniose. Cada uma destas linhas é discutida em um capítulo individual. A maior parte dos dados discutidos neste trabalho se referem a patologia, patogênese, interação patógeno-hospedeiro, imunidade inata e diagnóstico destas doenças. Ao invés de serem organizados como revisão de literatura tradicional, os capítulos enfatizam a contribuição científica das publicações do autor nestas áreas do conhecimento.

Palavras-chave: *Brucella*, *Salmonella*, *Leishmania*

ABSTRACT

Innate immunity, pathogenesis and diagnosis of salmonellosis, brucellosis, and leishmaniasis – Renato de Lima Santos

This work provides a systematic and critical review of part of the scientific production of its author. It includes three research topics, namely salmonellosis, brucellosis, and leishmaniasis. Each one of these topics is discussed in individual chapters. Most of the data discussed here refers to pathology, pathogenesis, host-pathogen interactions, innate immunity, and diagnosis of these diseases. Instead of being organized as a traditional literature reviews, the chapters actually emphasize the scientific contribution of the author's publications in each of these fields.

Key words: *Brucella*, *Salmonella*, *Leishmania*

Os artigos incorporados a este documento foram produzidos em co-autoria com vários alunos de graduação e de pós-graduação e docentes ou pesquisadores de várias instituições nacionais e estrangeiras. Como reconhecimento à contribuição valiosa e essencial de todos eles, os co-autores dos trabalhos que deram suporte ao presente texto estão listados a seguir.

Alunos, ex-alunos e pós-doutorandos orientados ou co-orientados pelo autor:

Alcina Vieira Carvalho Neta (Universidade Federal de Minas Gerais; atualmente professora da Universidade Estadual do Maranhão)

Aliny Pontes de Almeida (Universidade Federal de Minas Gerais)

Ana Luiza Sarkis Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais)

Ana Paula Reinato Stynen (Universidade Federal de Minas Gerais)

Antonio Augusto Munhoz Rodrigues (Universidade Federal de Minas Gerais)

Bruno de Paula Reis (Universidade Federal de Minas Gerais)

Cíntia Ferreira (Universidade Federal de Minas Gerais)

Custódio Antonio Carvalho Júnior (Universidade Federal de Minas Gerais)

Érica Azevedo Costa (Universidade Federal de Minas Gerais)

Fabiana Lessa Silva (Universidade Federal de Minas Gerais; atualmente docente da Universidade Estadual de Santa Cruz)

Felipe Machado Sant’Anna (Universidade Federal de Minas Gerais)

Isabela Oliveira de Paula Rêgo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Joicy Cortez de Sá (Universidade Estadual do Maranhão)

Juliana Pinto da Silva Mol (Universidade Federal de Minas Gerais)

Kristel Kegler Pangrazio (*Universidad Nacional de Asunción*, Paraguai)

Luciana Fachini da Costa (Universidade Estadual Paulista – Botucatu)

Mariana Noyma Xavier (Universidade Federal de Minas Gerais)

Mônica Silva Melo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Raquel Gonzaga de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais)

Raquel Lopes Hungueri dos Santos (Universidade Federal de Minas Gerais)

Regina Bueno (Universidade Federal de Minas Gerais; atualmente docente da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais)

Soraia de Araújo Diniz (Universidade Federal de Minas Gerais)

Tatiane Alves da Paixão (Universidade Federal de Minas Gerais; atualmente docente da UFMG)

Teane Milagres Augusto da Silva (Universidade Federal de Minas Gerais)

Telma da Mata Martins (Universidade Federal de Minas Gerais)

Valéria Spyridion Moustacas (Universidade Federal de Minas Gerais)

Vitor Laércio de Sá Leal Santos (Universidade Federal de Minas Gerais)

Docentes, pesquisadores ou outros profissionais:

Ada G. Cino (*Universidad Nacional de Asunción*, Paraguai)

Adriana Cortez (Universidade de São Paulo)

Álan Maia Borges (Universidade Federal de Minas Gerais)

Alda Izabel de Souza (Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal)

Alex Fiorini de Carvalho (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer)

Alexandre de Carvalho Pires (veterinário autônomo, Oliveira, MG)

Allan Kessell (*Texas A&M University*, EUA)

Allison R. Ficht (*Texas A&M University*, EUA)

Aly Fadly (*United States Department of Agriculture – USDA*, EUA)

Ana Lúcia Abreu-Silva (Universidade Estadual do Maranhão)

Andreas B. den Hartigh (*University of California at Davis*, EUA)

Andreas J. Bäuml (*University of California at Davis*, EUA)

Andres Avalos Ruiz Diaz (*Universidad Nacional de Asunción*, Paraguai)

Andrey Pereira Lage (Universidade Federal de Minas Gerais)

Anilton César Vasconcelos (Universidade Federal de Minas Gerais)

Aurora Maria Guimarães Gouveia (Universidade Federal de Minas Gerais)

Barbara M. Martin (*United States Department of Agriculture – USDA*, EUA)

Betânia P. Drumond (Universidade Federal de Minas Gerais)

Brian P. Butler (*University of California at Davis*, EUA)

Caeley Melmed (*Texas A&M University*, EUA)

Çagla Tükel (*University of California at Davis*, EUA)

Carlos A. Robles (*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA*, Argentina)

Carlos A. Rossetti (*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA*, Argentina)

Charles L. Bevins (*University of California at Davis*, EUA)

Christelle M. Roux (*University of California at Davis, EUA*)

Claudia V. Serra (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Laboratório Nacional Agropecuário – Pedro Leopoldo, MG)

Corrie C. Brown (*University of Georgia, EUA*)

Cristiane Alves Silva Menezes (Universidade Federal de Minas Gerais)

Cristina T. Kanamura (Instituto Adolfo Lutz)

Daniela Chessa (*University of California at Davis, EUA*)

David E. Verhoeven (*University of California at Davis, EUA*)

David Hunter (*Turner Enterprises Inc., EUA*)

Denise Amantino Magalhães L. Santos (*Texas A&M University, EUA*)

Denise Aparecida de Andrade Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais)

Enrique G. Dengues (*Universidad Nacional de Asunción, Paraguai*)

Ernane Fagundes do Nascimento (Universidade Federal de Minas Gerais)

Fabiana Magalhães Coelho (Universidade Federal de Minas Gerais)

Felix J. Sangari (*Universidad de Cantabria, Espanha*)

Fernando Padilla Poester (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor)

Flávio G. Fonseca (Universidade Federal de Minas Gerais)

Garry Myers (*J. Craig Venter Institute, EUA*)

George Dimitrov (*J. Craig Venter Institute, EUA*)

Gerhardt G. Schurig (*Virginia Tech University, EUA*)

Grazieli Marinheiro Machado (Universidade de Brasília)

Guillermo Zavala (*University of Georgia, EUA*)

Gwendolyn L. Carroll (*Texas A&M University, EUA*)

H. L. Shivaprasad (*University of California at Davis, EUA*)

Harris A. Lewin (*University of Illinois, EUA*)

Helene Andrews-Polymenis (*Texas A&M University, EUA*)

Herlandes Penha Tinoco (Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte)

Hiutung Chu (*University of California at Davis, EUA*)

Hoda Khouri (*J. Craig Venter Institute, EUA*)

Hortensia G. Rolán (*University of California at Davis, EUA*)

Ian T. Paulsen (*Macquarie University, Austrália*)

Ildikó Miranda (Fundação Ezequiel Dias)

Irene R. Grant (*The Queen's University of Belfast, Irlanda do Norte*)

Ivan Godinez (*University of California at Davis, EUA*)

Jairo Nunes (*Texas A&M University, EUA*)

Jane Megid (Universidade Estadual Paulista – Botucatu)

Janildo Ludolf Reis Júnior (Universidade de Brasília)

Jay K. Kolls (*Children's Hospital of Pittsburgh, EUA*)

Jay V. Solnick (*University of California at Davis, EUA*)

Jeffrey R. Robinson (*J. Craig Venter Institute, EUA*)

Jennifer Y. Chau (*University of California at Davis, EUA*)

Jeroen A. Schoffemeer (*Texas A&M University, EUA*)

Jian Zhang (*University of Georgia, EUA*)

Jorge R. Reis (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Laboratório Nacional Agropecuário – Belém, PA)

José Angel Gutiérrez-Pabello (*Universidad Nacional Autónoma de México*, México)

José Renato Junqueira Borges (Universidade de Brasília)

Josely Figueiredo (*Texas A&M University*, EUA)

Juan M. García Lobo (*Universidad de Cantabria*, Espanha)

Juan Romano (*Texas A&M University*, EUA)

Kathleen S. Logan (*Texas A&M University*, EUA)

Karen F. Snowden (*Texas A&M University*, EUA)

Karina Leite Miranda (Universidade Federal de Minas Gerais)

Karl A. Hassan (*Macquarie University*, Austrália)

Kirstin Barnhart (*Texas A&M University*, EUA)

Kong Wai Cheung (*University of California at Davis*, EUA)

L. Garry Adams (*Texas A&M University*, EUA)

Lauren M. Brinkac (*J. Craig Venter Institute*, EUA)

Leonardo José Richtzenhain (Universidade de São Paulo)

Luis Ernesto Samartino (*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA*, Argentina)

Mary B. Nabity (*Texas A&M University*, EUA)

Maarten F. de Jong (*University of California at Davis*, EUA)

Manuela Raffatellu (*University of California at Irvine*, EUA)

Maria Norma Melo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Maria Rosa Q. Bomfim (Universidade Federal de Minas Gerais)

Marc Henry (Universidade Federal de Minas Gerais)

Marcela Miranda Luppi (Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte)

Marcelo Campos Cordeiro Malta (Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte)

Marcos Bryan Heinemann (Universidade Federal de Minas Gerais)

Marijke Keesstra (*University of California at Davis, EUA*)

Marilene Suzan Marques Michalick (Universidade Federal de Minas Gerais)

Maurício Resende (Universidade Federal de Minas Gerais)

Meirivan S. Barbosa (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Laboratório Nacional Agropecuário – Belém, PA)

Melissa Libal (*Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, EUA*)

Melita A. Gordon (*University of Liverpool, Reino Unido*)

Michael D. George (*University of California at Davis, EUA*)

Michael J. Hornsby (*University of California at Davis, EUA*)

Naimes O. Paiva (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Laboratório Nacional Agropecuário – Belém, PA)

Neville P. Clarke (*National Center of Excellence for Foreign Animal & Zoonotic Disease Defense, EUA*)

Philip E. Elzer (*Louisiana State University, EUA*)

Phillip D. Beremand (*Texas A&M University, EUA*)

Qinghu Ren (*J. Craig Venter Institute, EUA*)

R. Paul Wilson (*University of California at Davis, EUA*)

Rafael Otávio Cançado Motta (Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte)

Raquel Soares Juliano (Universidade Federal de Goiás)

Rekha Seshadri (*J. Craig Venter Institute*, EUA)

Renée M. Tsois (*University of California at Davis*, EUA)

René R. Silva (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Laboratório Nacional Agropecuário – Belém, PA)

Ricardo Gonçalves (Universidade Federal de Minas Gerais)

Richard L. Walker (*California Animal Health and Food Safety Laboratory*, EUA)

Rita M. S. Nogueira de Candanedo Guerra (Universidade Estadual do Maranhão)

Robert A. Kingsley (*The Wellcome Trust Sanger Institute*, Reino Unido)

Robert T. DeBoy (*J. Craig Venter Institute*, EUA)

Robin E. Everts (*University of Illinois*, EUA)

Rodrigo Oliveira França (Universidade de Brasília)

Roger Smith III (*Texas A&M University*, EUA)

Ronaldo Furtini (Instituto Mineiro de Agropecuária)

Rosa Maria Esteves Arantes (Universidade Federal de Minas Gerais)

Roselene Ecco (Universidade Federal de Minas Gerais)

Samuel Angiuoli (*J. Craig Venter Institute*, EUA)

Sandee M. Hartsfield (*Texas A&M University*, EUA)

Sangeeta Khare (*Texas A&M University*, EUA)

Sara D. Lawhon (*Texas A&M University*, EUA)

Satya Dandekar (*University of California at Davis*, EUA)

Scott Hafner (*United States Department of Agriculture*, EUA)

Sean-Paul Nuccio (*University of California at Davis, EUA*)

Sebastian E. Winter (*University of California at Davis, EUA*)

Sergio Costa Oliveira (*Universidade Federal de Minas Gerais*)

Shirley Luckhart (*University of California at Davis, EUA*)

Shyrley P. Amarilla (*Universidad Nacional de Asunción, Paraguai*)

Shuping Zhang (*Texas A&M University, EUA*)

Silke Stender (*Max von Pettenkofer Institut, Alemanha*)

Stephanie Mulligan (*J. Craig Venter Institute, EUA*)

Steven C. Olsen (*United States Department of Agriculture, EUA*)

Sumathi Sankaran (*University of California at Davis, EUA*)

Sunny Cheng (*University of Georgia, EUA*)

Susan M. Williams (*University of Georgia, EUA*)

Susanne Miroid (*Max von Pettenkofer Institut, Alemanha*)

Tak W. Mak (*The Campbell Family Institute for Cancer Research, University Health Network, Canadá*)

Takeshi Haneda (*University of California at Davis, EUA*)

Tammy R. Beckham (*Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, EUA*)

Tatiana Scanoni Gomes (*Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal*)

Taylor Barbosa (*University of Georgia, EUA*)

Terry L. Thomas (*Texas A&M University, EUA*)

Thomas A. Ficht (*Texas A&M University, EUA*)

Thorsten Berger (*The Campbell Family Institute for Cancer Research, University Health Network, Canadá*)

Tsang Lau (*University of California at Davis, EUA*)

Vitor Salvador Picão Gonçalves (*Universidade de Brasília*)

Wagner Luiz Tafuri (*Universidade Federal de Minas Gerais*)

Walderez Ornelas Dutra (*Universidade Federal de Minas Gerais*)

Washington Luiz Tafuri (*Universidade Federal de Minas Gerais*)

William C. Nelson (*J. Craig Venter Institute, EUA*)

Wolf-Dietrich Hardt (*Institute for Microbiology, ETH Zurich, Suíça*)

Yao-Hui Sun (*University of California at Davis, EUA*)

Yuko Akiyama (*University of California at Davis, EUA*)

*“Il n'existe pas de sciences appliquées,
mais seulement des applications de la science”*

[Não existe ciência aplicada, mas somente a aplicação da ciência]

Louis Pasteur (1822 – 1895), em Lion, França, 11 de setembro de 1872.

A área de patologia veterinária permite grande amplitude de atuação em pesquisa científica, uma vez que se trata de disciplina básica para várias outras áreas da medicina veterinária. Além disso, a pesquisa em patologia permite possibilidades de interação com a pesquisa básica e de patologia comparada. Neste contexto, nosso grupo se estruturou priorizando pesquisas na área de patologia, patogênese e diagnóstico de doenças infecciosas. Detalhes sobre a composição atual do nosso grupo de pesquisa podem ser obtidos na base de dados do CNPq em <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/detalhegrupo.jsp?grupo=033350518IU3AK> (Diretório dos Grupos de Pesquisa cadastrados no CNPq).

Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão crítica dos trabalhos produzidos por nosso grupo de pesquisa e, principalmente, contextualizar a contribuição que estas publicações representam em seus respectivos campos de estudo. Os trabalhos selecionados para compor este texto incluem contribuições nos tópicos de salmonelose, brucelose e leishmaniose, o que evidencia o interesse do grupo por doenças infecciosas, particularmente aquelas com potencial zoonótico. Outro componente importante deste trabalho é que o mesmo foi também influenciado pelo interesse do grupo em doenças da reprodução, tendo em vista a formação prévia do autor nesta área (mestrado em reprodução animal).

O trabalho foi estruturado em capítulos abordando cada um dos três temas principais. A grafia original em inglês de diversos termos foi mantida para facilitar eventuais buscas em bases de dados pelos leitores interessados. Cabe salientar que nenhum dos capítulos seguintes tem como proposta uma revisão de literatura tradicional

ou completa dos tópicos abordados, mas sim a contextualização da produção científica do autor nos campos do conhecimento abordados. Portanto, para evitar a repetição enfadonha de dados originais já publicados, o texto é limitado na apresentação de dados, que são apresentados em sua integralidade na seção de anexos no formato de separatas dos trabalhos já publicados.

Cabe salientar que a produção científica do autor durante este período engloba vários itens, particularmente relacionados à patologia diagnóstica, que não foram incluídos no presente trabalho, para que o mesmo pudesse ser coeso e representativo dos principais tópicos de pesquisa desenvolvidos no período. Portanto, vale ressaltar que, devido ao critério adotado, diversos trabalhos bastante relevantes não serão incluídos nos capítulos subsequentes. Como exemplificação de contribuições relativamente relevantes que não serão incluídas, poderíamos mencionar trabalhos experimentais como a validação de métodos moleculares de diagnóstico de Febre Aftosa em condições de surto da doença a campo no Brasil (PAIXÃO et al., 2008 [Anexo 1]). Para execução deste estudo, desenvolvido em parceria com colaboradores americanos e com suporte financeiro do USDA (*United States Department of Agriculture*), foi necessário praticamente o deslocamento de um laboratório inteiro para as instalações do Ministério da Agricultura em Belém, PA (LANAGRO-Belém), além do estabelecimento da logística necessária para a colheita de material a campo durante dois surtos de Febre aftosa que ocorreram nos anos de 2004 e 2005, nos municípios de Carero da Várzea (AM) e Eldorado/Japorã (MS), respectivamente. Cabe ressaltar que o método de diagnóstico mencionado permite identificar animais infectados ainda durante o período de incubação, sendo que o tempo requerido para sua execução pode ser medido em poucas horas, enquanto o método tradicional de isolamento viral requer

vários dias para um resultado definitivo. Tal agilidade no diagnóstico é extremamente importante no caso de uma doença altamente contagiosa e da mais absoluta relevância sanitária e econômica, como é o caso da Febre Aftosa. Outros trabalhos experimentais relevantes incluem o desenvolvimento de um método de diagnóstico *in situ* para reticuloendoteliose, que proporcionou a expansão do conhecimento da patogênese da doença (SANTOS et al., 2008a [Anexo 2]) e um método para diagnóstico da infecção por *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (KHARE et al., 2004 [Anexo 3]), que permitiu aumento da sensibilidade diagnóstica pela associação de método imunomagnético com amplificação de DNA genômico do organismo a partir de amostras de fezes ou leite (KHARE et al., 2004 [Anexo 3]), o que melhora enormemente a eficiência do diagnóstico se comparado ao isolamento do organismo, que neste caso é um processo extremamente demorado. A relevância deste trabalho pode ser comprovada pelas dezenas de citações do mesmo nas bases de dados *Scopus* e *Web of Science*.

Um número significativo de publicações sobre estudo de casuística ou relatos de casos, que são um aspecto relevante do trabalho de pesquisa na área de patologia diagnóstica, também não foram incluídos nos capítulos subsequentes deste texto. Para exemplificar a importância de alguns destes trabalhos, menciono o primeiro relato de infecção por herpesvírus ovino tipo 2 em equino, um dos agentes causadores de Febre Catarral Maligna em bovinos (COSTA et al., 2009 [Anexo 4]), a primeira confirmação *in situ* da infecção por *Sarcocystis neurona* associado a mieloencefalite no Brasil (PAIXÃO et al., 2007 [Anexo 5]) e o primeiro relato de meningioma orbital em bovino (REIS JR. et al., 2007 [Anexo 6]).

Os trabalhos listados abaixo foram mencionados nesta introdução, estando suas separatas incluídas na seção de anexos.

PAIXÃO, T. A., CARVALHO NETA, A. V., **SANTOS, R. L.**, PAIVA, N. O., REIS, J. R., BARBOSA, M. S., SERRA, C. V., SILVA, R. R., BECKHAM, T. R., MARTIN, B. M., CLARKE, N. P., ADAMS, L. G. Diagnosis of Foot-and Mouth Disease by real time RT-PCR under field conditions in Brazil. *BMC Veterinary Research*, v.4, n.53, 2008 (**Anexo 1**).

SANTOS, V. L. S. L., WILLIAMS, S. M., BARBOSA, T., ZAVALA, G., ZHANG, J., CHENG, S., SHIVAPRASAD, H. L., HAFNER, S., FADLY, A., **SANTOS, R. L.**, BROWN, C. C. Detection of reticuloendotheliosis virus by immunohistochemistry and in situ hybridization in experimentally infected Japanese quail embryos and archived formalin-fixed and paraffin embedded tumors. *Avian Pathology*, v. 37, p. 451-456, 2008a (**Anexo 2**).

KHARE, S., FICHT, T. A., **SANTOS, R. L.**, ROMANO, J., FICHT, A. R., ZHANG, S., GRANT, I. R., LIBAL, M., HUNTER, D., ADAMS, L. G. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.3, p.1075-1081, 2004 (**Anexo 3**).

COSTA, E. A., BOMFIM, M. R. Q., FONSECA, F. G., DRUMOND, B. P., COELHO, F. M., VASCONCELOS, A. C., FURTINI, R., PAIXÃO, T. A., TSOLIS, R. M.,

SANTOS, R. L., RESENDE, M. Ovine Herpesvirus 2 Infection in Foal, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, p. 844-845, 2009 (**Anexo 4**).

PAIXÃO, T. A., RÊGO, I. O. P., **SANTOS, R. L.** Anti-*Sarcocystis neurona* immunostaining associated with equine protozoal myeloencephalitis (EPM) in Brazil. *Ciência Rural*. v.37, n.6, p.1820-1823, 2007 (**Anexo 5**).

REIS JR., J. L., KANAMURA, C. T., MACHADO, G. M., FRANÇA, R. O., BORGES, J. R. J., **SANTOS, R. L.** Orbital (retrobulbar) meningioma in a Simmental cow. *Veterinary Pathology*, v.44, n.4, p.504-507, 2007 (**Anexo 6**).

CAPÍTULO 2. IMUNIDADE INATA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR *SALMONELLA ENTERICA*

2.1. Salmonelose

O termo salmonelose se refere à doença causada pela infecção por organismos do gênero *Salmonella* no homem e em diversas espécies de animais. Durante os últimos anos, inclusive durante o período de doutoramento do autor na *Texas A&M University* (1998 – 2001; College Station, Texas, EUA), nosso grupo produziu, além de artigos com dados originais, algumas publicações de revisão de literatura que serão utilizadas na elaboração deste texto (SANTOS et al., 2001a [Anexo 7]; ZHANG et al., 2003 [Anexo 8]; SANTOS et al., 2003 [Anexo 9]; SANTOS & BAUMLER, 2004 [Anexo 10]; SANTOS et al., 2009 [Anexo 11]). A infecção por *Salmonella* no homem e nos animais domésticos, sempre envolve algum sorotipo da espécie *Salmonella enterica*. São reconhecidos mais de 2.500 diferentes sorotipos de *S. enterica* (BRENNER et al., 2000), sendo alguns considerados hospedeiro-específicos, como *S. enterica* sorotipos Typhi, Paratyphi A, B e C, que em condições naturais só infectam o homem, enquanto outros sorotipos são hospedeiro-adaptados, como *S. enterica* sorotipos Cholerasuis e Dublin, que tem suínos e bovinos como hospedeiros preferenciais, respectivamente. Existem ainda inúmeros sorotipos, como o Typhimurium, que infectam ampla variedade de espécies de hospedeiros (MEAD et al., 1999).

Sob o ponto de vista da doença no homem, os sorotipos Typhi e Paratyphi A, B e C, causam uma doença sistêmica denominada febre tifóide. Os sorotipos adaptados a outros hospedeiros, como Cholerasuis e Dublin, podem esporadicamente infectar o

homem, podendo resultar em quadro bacterêmico. Contudo, a manifestação mais comum de salmonelose no homem é uma doença entérica causada pela infecção por sorotipos não-tifóides, principalmente os sorotipos Typhimurium e Enteritidis. Nestes casos, a doença é decorrente de infecção alimentar, sendo as principais fontes de infecção, produtos de origem animal contaminados, principalmente ovos e carne de frango, porco ou bovino (GALBRAITH, 1961; MEAD et al., 1999; STEVENS et al., 2009).

2.2. Mecanismos moleculares de patogênese de *Salmonella enterica*

Nesta seção serão discutidos primariamente os mecanismos da patogênese da enterite induzida por *Salmonella* não-tifóide e, eventualmente alguns mecanismos de patogênese de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, principalmente para fins de comparação.

No início da década de 1990, as técnicas de manipulação genética de *Salmonella*, propiciaram um avanço muito significativo no conhecimento da patogênese deste organismo (FALKOW, 2004). A partir desta fase, vários genes codificadores de fatores de virulência de *Salmonella* foram identificados e, geralmente, mapeados em regiões do genoma conhecidas como ilhas de patogenicidade (SPI, do inglês *Salmonella Pathogenicity Island*). As duas primeiras SPIs identificadas são extremamente importantes para a patogenicidade de *Salmonella*, por codificarem componentes e efetores de sistemas de secreção do tipo III – SST3 (ZHANG et al., 2003 [Anexo 8]; SANTOS et al., 2003 [Anexo 9]). Os SST3 tem estrutura semelhante a uma agulha de injeção (KUBORI et al., 2000) que permite a translocação de proteínas efetoras

bacterianas diretamente no citoplasma de células do hospedeiro. Estas proteínas efetoras influenciam vias de sinalização intracelular e o citoesqueleto da célula (DARWIN & MILLER, 1999; DEVINNEY et al., 2000; GALÁN & ZHOU, 2000). O SST3 codificado pela SPI-1 é essencial para invasão da mucosa intestinal, enquanto o SST3 da SPI-2 é essencial para sobrevivência intracelular da *Salmonella* em células do hospedeiro, particularmente em macrófagos (ZHANG et al., 2003 [Anexo 8]; SANTOS et al., 2003 [Anexo 9]). Estes dois SST3 são essenciais para a patogenicidade de *Salmonella*, uma vez os mesmos afetam duas etapas essenciais durante a infecção, que são a invasão da mucosa intestinal e a sobrevivência intracelular em células do hospedeiro, etapas cruciais durante a infecção *in vivo*, conforme detalhado em uma de nossas publicações (SANTOS & BAUMLER, 2004 [Anexo 10]). Neste contexto, nosso grupo deu uma contribuição ao desenvolver uma metodologia original, associando um modelo específico de infecção *in vivo* (detalhado abaixo), com métodos imunohistoquímicos, para avaliação detalhada da cinética de invasão intestinal pela *Salmonella* (REIS et al., 2003 [Anexo 12]).

Nos anos subsequentes, à medida que o conhecimento sobre a estrutura e o funcionamento dos SST3 foram sendo aprofundados e novos fatores de virulência foram identificados, nosso grupo teve condição de dar contribuições extremamente importantes, que consistiram na identificação dos efetores secretados pelo SST3 codificado pela SPI-1 necessários para invasão de células intestinais pela *Salmonella* (SANTOS et al., 2001b/c [Anexos 13 e 14]; ZHANG et al., 2002a/b [Anexos 15 e 16]; REIS et al., 2003 [Anexo 12]). Este conjunto de experimentos resultou na identificação de efetores secretados pelo SST3 codificado pela SPI-1 necessários para a invasão da mucosa intestinal e desencadeamento da enterite induzida pelo sorotipo Typhimurium.

Com isso, foram identificadas as cinco proteínas efetoras (SipA, SopA, SopB, SopD e SopE2) essenciais para plena enteropatogenicidade da *S. Typhimurium* (ZHANG et al., 2002b [Anexo 16]).

Embora nossos trabalhos tenham possibilitado contribuir para o conhecimento dos mecanismos de virulência de *Salmonella*, o principal foco dos nossos estudos é a interação patógeno-hospedeiro, com vistas a geração de dados originais sobre a resposta do hospedeiro à infecção. Esta linha de trabalho pode ser ilustrado por um dos nossos estudos iniciais com análise transcriptômica de macrófagos infectados com *Salmonella*, ainda utilizando a técnica de mRNA *differential display* (LIANG & PARDEE, 1992), que nos permitiu demonstrar a supressão da expressão de um transportador de cálcio, PMCA (*plasma membrane calcium-transporting ATPase*), durante a infecção (SANTOS et al., 2002a [Anexo 17]). Outra publicação que ilustra bem esta linha de estudo foi a demonstração da capacidade da *Salmonella* aderir através de uma de suas proteínas de superfície (ShdA), que tem afinidade por fibronectina, o que pode favorecer a colonização, persistência e eliminação do organismo por via fecal (KINGSLEY et al., 2002 [Anexo 18]).

Ainda neste contexto de interação patógeno-hospedeiro, ao final da década de 1990, foi observado independentemente por vários grupos, que a *Salmonella* tem a capacidade de induzir morte celular em macrófagos (CHEN et al., 1996; LINDGREN et al., 1996; MONACK et al., 1996) e em células dendríticas (VAN DER VELDEN et al., 2003). Estudos subsequentes demonstraram que a ação citotóxica da *Salmonella* é dependente de um SST3 (codificado pela SPI-1) funcional e que o processo é dependente de caspase 1 (LUNDBERG et al., 1999; VAN DER VELDEN et al., 2000; SANTOS et al., 2001b [Anexo 13]), embora tenha sido também descrita uma via tardia

de citotoxicidade independente do SST3/SPI-1 (VAN DER VELDEN et al., 2000; SANTOS et al., 2001b [Anexo 13]). Considerando-se o papel da caspase 1 na clivagem e ativação de seus substratos, IL-1 β e IL-18 (citocinas fortemente pró-inflamatórias, daí este complexo ser denominado inflamassomo), este mecanismo tem sido interpretado como um dos mecanismos pró-inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento da enterite neutrofílica aguda observada nos casos de infecção por sorotipos não tifóides de *Salmonella*. Portanto, considerando-se que, por definição, apoptose é uma forma de morte celular programada que não resulta em inflamação, o Dr. Brad Cookson propôs o termo piroptose (*pyroptosis*, em inglês) para este mecanismo de morte celular dependente da ativação de caspase 1 (BRENNAN & COOKSON, 2000; BERGSBAKEN et al., 2009). Mais recentemente, descobriu-se que a ativação da caspase 1 se dá via Ipaf, um receptor citoplasmático de padrões moleculares de patógenos (tipo NOD), que reconhece flagelina, translocada promiscuamente para o citoplasma da célula do hospedeiro pelo SST3/SPI-1 (FRANCHI et al., 2006; MIAO et al., 2006). Embora inicialmente descrito como mecanismo de patogênese da *Salmonella* por induzir morte celular em macrófagos, este mecanismo tem sido interpretado recentemente como um mecanismo de imunidade inata do hospedeiro, uma vez que a lise do macrófago infectado expõe a *Salmonella* ao meio extracelular e aos neutrófilos que são bactericidas para *Salmonella* (MIAO et al., 2010). Apesar de vários estudos demonstrando os mecanismos da indução de morte celular em macrófagos por *Salmonella*, até recentemente não havia comprovação da ocorrência de tal fenômeno *in vivo*. Em um dos nossos trabalhos iniciais, não foi possível demonstrar causa e efeito deste fenômeno em bovinos (SANTOS et al., 2001c [Anexo 14]), mas recentemente tivemos a oportunidade de demonstrar a ocorrência de morte celular associada à

infecção por *Salmonella in vivo* em primatas não humanos (Figura 1), certamente um modelo da maior relevância biológica (SANTOS et al., 2011 [Anexo 19]).

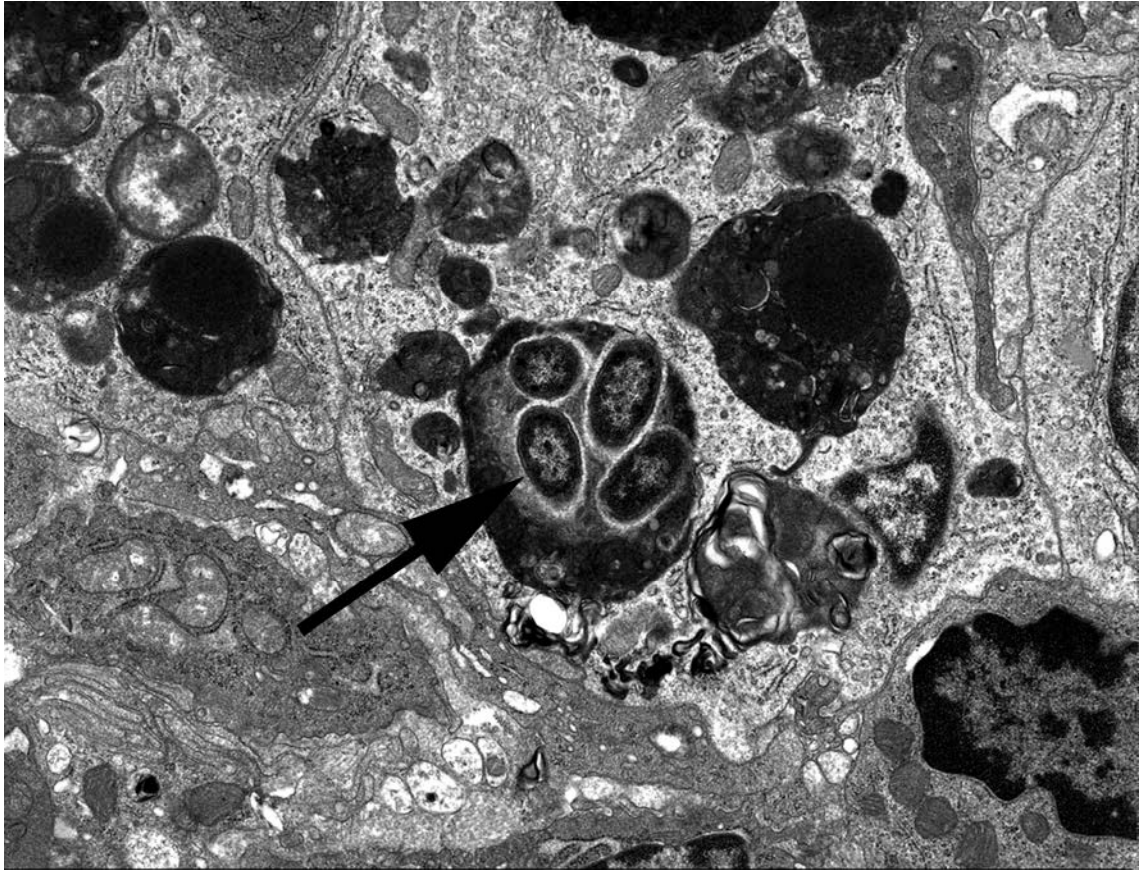


Figura 1. Múltiplos organismos (seta) com morfologia compatível com *Salmonella* sp. em um corpúsculo apoptótico na lâmina própria intestinal de um macaco rhesus (*Macaca mulatta*) experimentalmente inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (Fonte: SANTOS et al., 2011 [Anexo 19]).

Conforme evidenciado acima, nosso estudo da patogênese da infecção por *Salmonella* está fortemente vinculada a capacidade enteropatogênica deste organismo, o que, por sua vez, se deve a ocorrência de intensa resposta inflamatória aguda da mucosa intestinal em resposta a invasão por sorotipos não-tifóides de *Salmonella*. Contudo, há diferenças marcantes do ponto de vista clínico e patológico entre as infecções por

Salmonella não-tifóide e febre tifóide (causada pelos sorotipos Typhi e Paratyphi A, B ou C, no homem). Apesar de todos estes sorotipos apresentarem semelhante potencial de invasibilidade na mucosa intestinal, no caso da febre tifóide, a manifestação entérica, quando ocorre, é crônica com predomínio de infiltrado inflamatório histiocitário, o que contrasta com os sorotipos não tifóides, que causam resposta inflamatória aguda no intestino, com intenso infiltrado neutrofílico (SANTOS et al., 2001a [Anexo 7]). Portanto, uma questão biológica relevante é o que faz com que organismos semelhantes (i.e. sorotipos tifóides e não-tifóides) possam desencadear respostas tão distintas, sobretudo porque os sorotipos tifóides também possuem moléculas fortemente pró-inflamatórias, como LPS e flagelina. Uma diferença marcante entre os sorotipos Typhimurium e Typhi é que este último é capsulado, ou seja, possui uma camada de polissacarídeo Vi, cuja biosíntese é dependente do locus *viaB* (HASHIMOTO et al., 1991; KOLYVA et al., 1992). A ausência do locus *viaB* faz com que o sorotipo Typhi seja capaz de desencadear uma resposta pró-inflamatória aguda em modelo de células epiteliais intestinais (SHARMA & QADRI, 2004). Um trabalho realizado por nosso grupo (RAFFATELLU et al., 2007 [Anexo 20]), demonstrou a relevância destes achados *in vivo*, nos modelos murino e bovino. Contudo, estudos mais recentes demonstraram que a ação direta do antígeno capsular é secundária, uma vez que o locus *viaB* codifica o TviA, um fator de transcrição responsável pela supressão da expressão de flagelina, que tem papel importante na indução de resposta pró-inflamatória pela *S. Typhimurium* (WINTER et al., 2010). Recentemente concluímos um estudo no modelo bovino confirmando a relevância deste mecanismo *in vivo* (dados não publicados).

2.3. Modelos animais em salmonelose

O camundongo tem sido amplamente utilizado como modelo para salmonelose (SANTOS et al., 2001a [Anexo 7]). Ocorre que a infecção por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, que no homem e em algumas espécies de animais domésticos causa enterite e diarreia, no camundongo resulta em doença sistêmica, muito semelhante à febre tifóide, causada pelo sorotipo Typhi no homem (WATSON & HOLDEN, 2010). No camundongo, a *S. Typhimurium* multiplica-se rapidamente no fígado e baço resultando em hepatomegalia e esplenomegalia (TSOLIS et al., 1999a). As alterações intestinais nesses casos são caracterizadas predominantemente por infiltrado histiocitário discreto, com hiperplasia linfóide e ulcerações focais nas placas de Peyer em animais moribundos (SANTOS et al., 2001a [Anexo 7]). Mesmo com estas limitações, o camundongo tem sido amplamente utilizado e foi importantíssimo para o estabelecimento de vários conceitos básicos de patogênese e resposta imune do hospedeiro à *Salmonella*.

Em contraste com a manifestação clínica da infecção por *S. Typhimurium* em camundongos, os bovinos, particularmente bezerros, desenvolvem uma doença entérica que mimetiza a manifestação clínica da infecção por sorotipos não-tifóides no homem (SANTOS et al., 2001a [Anexo 7]; TSOLIS et al., 1999a). No bovino ocorre inflamação intestinal aguda, caracterizada por intenso infiltrado neutrofílico, necrose superficial da mucosa e deposição de grandes quantidades de fibrina (Figura 2), principalmente sobre as placas de Peyer (TSOLIS et al., 1999b; SANTOS et al., 2002b [Anexo 21]).

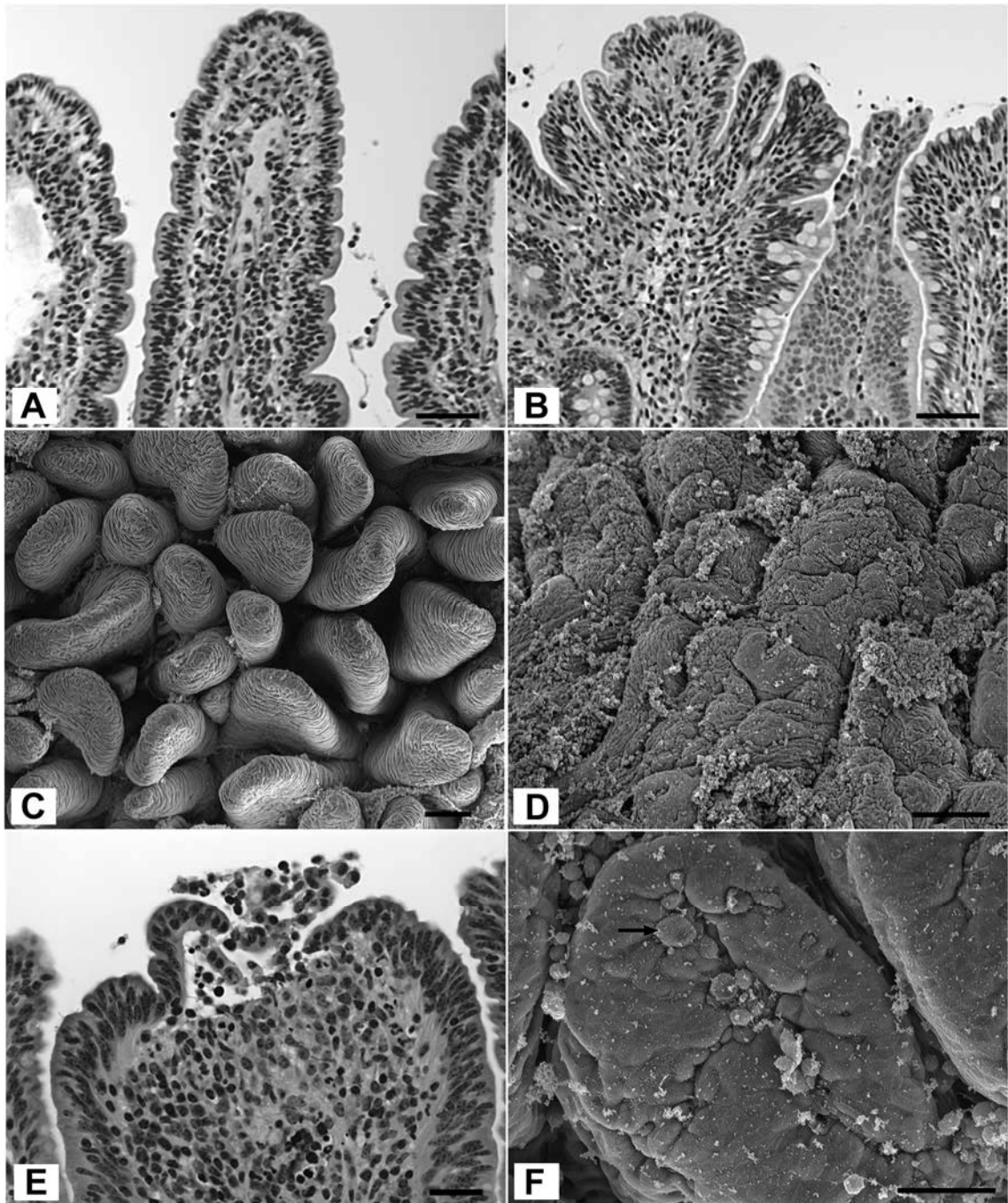


Figura 2. (A) Mucosa intestinal normal de um bezerro. Barra=50 μm . (B) Intestino duas horas após infecção com *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, com retração acentuada das vilosidades. Barra=50 μm . (C) Microscopia eletrônica de varredura da mucosa intestinal normal na placa de Peyer. Barra=100 μm . (D) Mucosa intestinal 3 horas após infecção. Barra=100 μm . (E) Mucosa intestinal 3 horas após infecção, com desprendimento de enterócitos e erosão na extremidade da vilosidade. Barra=30 μm . (F) Microscopia de varredura do mesmo segmento de (E). Barra=30 μm . Fonte: SANTOS et al., 2002b (Anexo 21).

Conforme descrito detalhadamente em um de nossos trabalhos (SANTOS et al., 2002c [Anexo 22]), salmonelose experimental em bezerros resulta em acidose metabólica, hipoglicemia e resposta inflamatória aguda associada a aumento na concentração de fibrinogênio e neutropenia acentuada imediatamente após a inoculação (SANTOS et al., 2002c [Anexo 22]). Apesar de ser excelente modelo para a doença humana, infecções experimentais em bezerros têm limitações significativas em termos de custo, de infraestrutura necessária e de implicações éticas. Por isso, após os experimentos iniciais com infecção experimental por via oral (SANTOS et al., 2002c [Anexo 22]), passamos a adotar um modelo de ligadura intestinal. Neste modelo (SANTOS et al., 2001c [Anexo 14]; SANTOS et al., 2002b [Anexo 21]), o bezerro, sob anestesia geral inalatória, é submetido a laparotomia, sendo realizadas ligaduras no íleo, isolando segmentos de comprimento pré-determinado (Figura 3). Diferentes cepas (inclusive o veículo estéril, como controle) podem ser inoculadas diretamente no lúmen destes segmentos isolados e amostras (segmentos ligados íntegros) podem ser removidas em diversos tempos após a inoculação. Este modelo apresenta vantagens significativas, pois permite a sincronização da infecção, elimina o sofrimento do animal que permanece sob anestesia profunda durante todo o procedimento experimental. Além disso, outra grande vantagem é que este modelo reduz drasticamente o número de animais necessários para um dado experimento, uma vez que o tratamento controle e diferentes cepas podem ser inoculadas em um único animal. Em nossa experiência, é possível manter os animais em boas condições sob anestesia por até 12 horas (ALVES et al., 2003 [Anexo 23]), sendo possível a preparação de até, aproximadamente, 18 segmentos isolados do intestino. Dada a perfeita sincronização da infecção neste

modelo, é possível examinar fenômenos precoces da cinética de invasão do patógeno (REIS et al., 2003 [Anexo 12]). Até mesmo antes do advento do RT-PCR em tempo real, este modelo nos permitiu realizar uma avaliação semi-quantitativa da expressão gênica associada a imunidade inata no bezerro (SANTOS et al., 2002b [Anexo 21]).



Figura 3. Modelo de ligadura intestinal em bezerro. Segmento isolado para inoculação.

Outro aspecto interessante do modelo de ligadura intestinal é que o volume de fluído acumulado no lúmen intestinal pode ser facilmente mensurado (Figura 4) e representa uma estimativa acurada da intensidade de diarreia (SANTOS et al., 2001c [Anexo 14]). Este modelo permitiu que nosso grupo contribuísse com avanços significativos no conhecimento da patogênese da enterite induzida por *Salmonella* e da resposta do hospedeiro à infecção (SANTOS et al., 2001c [Anexo 14]; SANTOS et al.,

2002a/b [Anexos 17 e 21]; ZHANG et al., 2002a/b [Anexos 15 e 16]; REIS et al., 2003 [Anexo 12]; RAFFATELLU et al., 2007 [Anexo 20]).

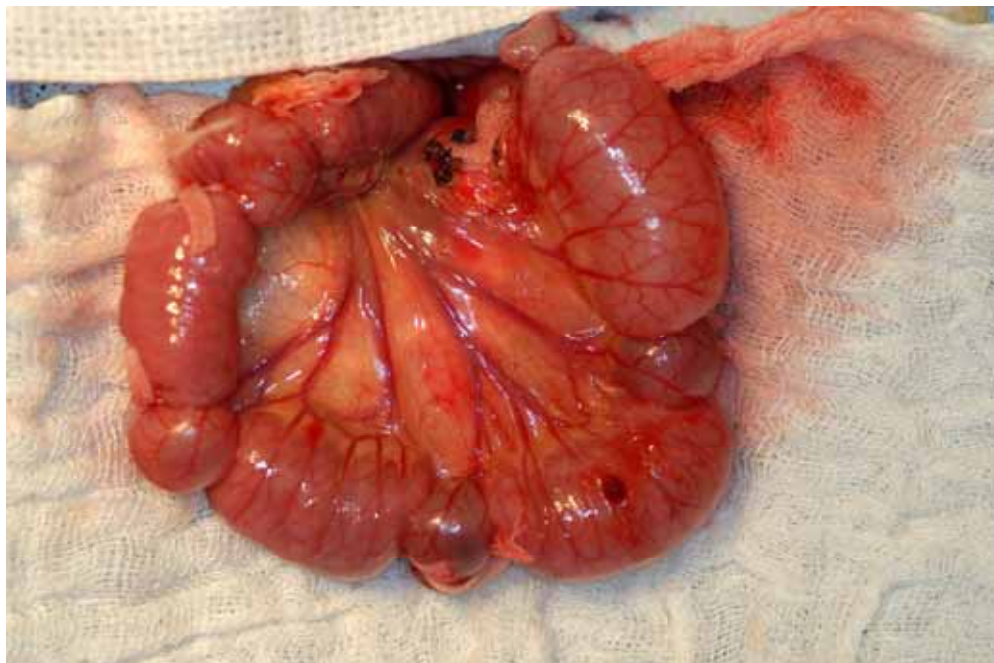
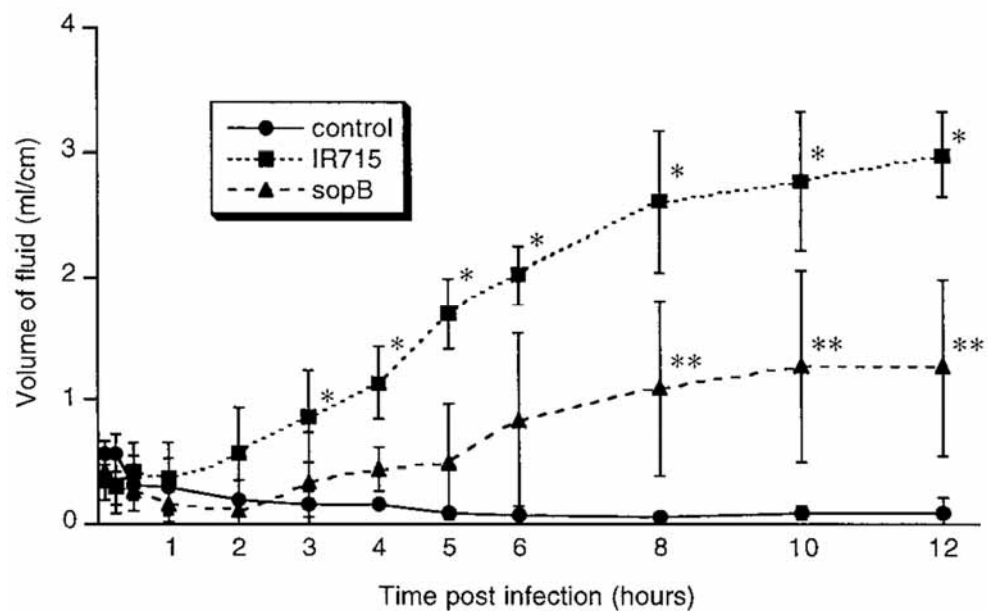


Figura 4. Acúmulo de fluido intestinal durante infecção experimental por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium em bezerro. (A) Resposta à cepa virulenta (IR715) e mutante atenuado (sopB); fonte: SANTOS et al., 2001c (Anexo 14). (B) Segmentos intestinais de *Macaca mulatta* inoculados com a cepa virulenta (direita) e meio estéril (controle à esquerda). Os dois segmentos intermediários foram inoculados com cepas mutantes atenuadas.

As limitações do modelo murino de infecção para estudo da enterite induzida por *Salmonella*, foram parcialmente contornadas com base em observações iniciais de que a flora intestinal normal influencia de forma marcante o curso da infecção em camundongos (NARDI et al., 1989). Estas informações permitiram o desenvolvimento de um modelo murino de infecção baseado no pré-tratamento dos animais com estreptomicina, que resulta em supressão da flora normal (BARTHEL et al., 2003). Nestas condições, os camundongos desenvolvem um quadro de tiflo-colite neutrofílica aguda e, apesar de continuarem apresentando disseminação sistêmica do patógeno e de o processo ser quase completamente restrito ao ceco, a resposta inflamatória se assemelha àquela observada no bezerro. Este modelo expandiu enormemente as possibilidades de utilização do camundongo, que é um modelo experimental mais conveniente do que o bovino, além de permitir o uso de animais geneticamente modificados (*knockouts*) ampliando significativamente as condições experimentais para obtenção de dados sobre os mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro. Nosso grupo tem utilizado este modelo, frequentemente, em paralelo ao modelo de ligadura intestinal em bovinos ou cultivo celular, o que permitiu aprofundamento dos estudos sobre a resposta inflamatória à infecção, conforme evidenciado em publicações recentes (RAFFATELLU et al., 2007 e 2009 [Anexos 20 e 24]; GODINEZ et al., 2008 e 2009 [Anexos 25 e 26]). A experiência acumulada nos últimos anos nos permitiu elaborar um novo artigo de revisão sobre modelos animais de salmonelose, que foi recentemente aceito para publicação na *Infection and Immunity* (TSOLIS et al., 2011 [Anexo 27]).

2.4. Modelos de co-infecção

O avanço no conhecimento sobre a patogênese de *Salmonella* e a interação patógeno-hospedeiro em salmonelose, nos proporcionou condições para investigar questões mais complexas como co-infecções. Esta etapa de estudos teve início durante o estágio sabático do autor, período em que atuou como professor visitante na *University of California at Davis* (2006-2007). O desafio fundamental neste projeto foi o de identificar os mecanismos que faziam com que a *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, cuja infecção em indivíduos saudáveis resulta em letalidade de, aproximadamente, 0,5%, pode causar letalidade de mais de 70% em indivíduos portadores do HIV, considerando recorrências (GORDON et al., 2002). Este aumento de letalidade está associado ao maior risco de bacteremia nos pacientes portadores de HIV (GORDON et al., 2002). Para este fim, estabelecemos um modelo de co-infecção em primatas não humanos com o apoio de infraestrutura do *California National Primate Research Center* (Davis, Califórnia, EUA). Macacos rhesus (*Macaca mulatta*) foram previamente inoculados com SIV, que causa doença muito semelhante a produzida por HIV no homem, inclusive com sinais compatíveis com a AIDS. Estes animais foram permanentemente monitorados e, antes de desenvolverem sinais sistêmicos de imunossupressão, foram submetidos a laparotomia para preparação de ligaduras intestinais e inoculação com *S. Typhimurium*. Durante o período inicial de infecção com SIV, há depleção marcante de linfócitos T CD4⁺ na mucosa intestinal, enquanto o número destas células no sangue periférico continua dentro dos valores de referência (MATTAPALLIL et al., 2005). Com este estudo, detalhado no Anexo 27, foi possível demonstrar que a depleção na população de linfócitos T CD4⁺, com fenótipo de células de memória imunológica, da mucosa intestinal, resulta em falha produção de IL-17 e de

outras citocinas associadas à resposta inata e integridade da mucosa intestinal e que também influenciam a produção de peptídeos antibacterianos pela mucosa intestinal. Desta forma há maior translocação bacteriana resultando em aumento significativo no número de organismos no linfonodo mesentérico, indicando maior disseminação sistêmica (RAFFATELLU et al., 2008 [Anexo 28]). Além de ter sido publicado em um periódico da mais absoluta respeitabilidade na área biomédica (*Nature Medicine*) e contar com elevado número de citações (79 e 99 segundo as bases de dados *ISI Web of Science* e *Scopus*, respectivamente, em 05 de fevereiro de 2011), este trabalho tem tido grande reconhecimento não somente no campo da salmonelose, mas principalmente na área de pesquisa de HIV e AIDS, conforme evidenciado por artigo de revisão recentemente publicado no *Current Opinion in HIV and AIDS*. Este artigo traz nosso trabalho referenciado e com forte recomendação para leitura, considerado pelos autores que não pertencem ao nosso grupo como “outstanding interest” (CECCHINATO & FRANCHINI, 2010), além de ter motivado a publicação de artigo de revisão por colaboradores do nosso grupo que atuam na área de HIV (DANDEKAR et al., 2010). A demonstração do papel da IL-17 e linfócitos T CD4⁺, com fenótipo de memória imunológica, na prevenção da disseminação sistêmica de *Salmonella*, representou uma grande contribuição para o conhecimento do papel da IL-17 e de outras citocinas na manutenção da integridade da barreira da mucosa intestinal, inclusive modulando a expressão de peptídeos antimicrobianos pelo hospedeiro e a imunidade inata contra patógenos enteroinvasivos (LIU et al., 2009).

Além das implicações óbvias no campo da pesquisa sobre HIV, como desdobramento deste projeto de co-infecção com SIV, foi possível avançar significativamente no estudo da resposta do hospedeiro à salmonelose, tendo sido

demonstrado o papel decisivo do eixo IL-17/IL-23 na resposta inata a infecção por *Salmonella* (GODINEZ et al., 2009 [Anexo 26]). O papel desta mesma resposta na indução de peptídeos antimicrobianos, particularmente lipocalina-2, também foi estabelecido, cujo efeito é anulado pela *Salmonella*, conferindo-lhe vantagem competitiva contra organismos da flora intestinal (RAFFATELLU et al., 2009 [Anexo 24]). Este mecanismo faz com que em condições de inflamação intestinal, induzida pela própria *Salmonella*, ocorra supressão da população de organismos da flora intestinal normal e favorecimento à proliferação de *Salmonella* (SANTOS et al., 2009 [Anexo 11]).

Outra linha recentemente iniciada foi o estudo de co-infecção de *Salmonella* não-tifóide e malária. À semelhança do que ocorre nos casos de pacientes imunossuprimidos devido à infecção por HIV, pacientes com malária, particularmente pacientes pediátricos, têm elevado risco de desenvolvimento de bacteremia devido à disseminação sistêmica de sorotipos não-tifóides de *Salmonella* (GRAHAM et al., 2000; BRONZAN et al., 2007). Considerando-se que o camundongo tem sido utilizado como modelo para estudo da patogênese de malária pela infecção com espécies de *Plasmodium* spp. adaptadas a esta espécie (SILVA et al., 2011) e o modelo murino de infecção por *Salmonella*, conforme descrito acima, foi possível desenvolver um modelo de co-infecção segundo descrito por ROUX et al. (2010 [Anexo 29]). Este trabalho demonstrou que camundongos infectados com *Plasmodium* sp. apresentam disseminação mais intensa (1000 vezes mais) de *S. Typhimurium* para sítios sistêmicos de infecção, quando comparados a camundongos controle (ROUX et al., 2010 [Anexo 29]). Recentemente desenvolvemos um modelo de co-infecção de *Plasmodium* e *S. Typhimurium* em primatas não humanos, cujos resultados ainda não foram publicados.

2.5. Síntese da contribuição na área de salmonelose

O conjunto de trabalhos discutidos acima nos permitiu caracterizar detalhadamente a cinética de invasão da *S. Typhimurium* na mucosa intestinal, os fatores de virulência da bactéria requeridos para este processo, o padrão morfológico de resposta do hospedeiro e vários dos mecanismos moleculares, tanto do lado do agente quanto do hospedeiro, desencadeados pela interação patógeno-hospedeiro. O estágio atual da compreensão da interação patógeno-hospedeiro na salmonelose não tifóide está bem descrito em nosso artigo de revisão recentemente publicado em *Trends in Microbiology* (SANTOS et al., 2009 [Anexo 11]), que detalha a resposta inflamatória aguda induzida por *Salmonella*. Enquanto esta resposta inflamatória contribui para a prevenção da disseminação sistêmica do organismo, cria um ambiente intestinal fortemente desfavorável à flora intestinal normal, mas favorável à proliferação da *Salmonella* e consequente contaminação ambiental e transmissão para novos hospedeiros (SANTOS et al., 2009 [Anexo 11]).

Paralela a contribuição científica representada por este conjunto de trabalhos, tivemos a oportunidade de produzir alguns artigos de divulgação científica, que resultaram em duas publicações na revista *Ciência Hoje* (SANTOS & ADAMS, 2001 [Anexo 30]; SANTOS et al., 2008b [Anexo 31]) e uma matéria no *Jornal do Brasil* (Rio de Janeiro, domingo, 30 de novembro de 2008, p. A31).

Os trabalhos listados abaixo foram mencionados neste Capítulo, tendo sido suas separatas incluídas na seção de anexos, onde estão disponíveis todos os dados que deram suporte a dissertação acima.

SANTOS, R. L., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., KINGSLEY, R. A., ADAMS, L. G. BAUMLER, A. J. Animal models of *Salmonella* infections: gastroenteritis vs. typhoid fever. *Microbes & Infection*, v.3, n.14-15, p.1335-1344, 2001a (**Anexo 7**).

ZHANG, S., KINGSLEY, R. A., **SANTOS, R. L.,** ANDREWS-POLYMENIS, H., RAFFATELLU, M., FIGUEIREDO, J., NUNES, J., TSOLIS, R. M., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and Immunity*, v.71, n.1, p.1-12, 2003 (**Anexo 8**).

SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis: a review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Sciences*, v.36, n.1, p.3-12, 2003 (**Anexo 9**).

SANTOS, R. L., BÄUMLER, A. J. Cell tropism of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, v.294, n.4, p.225-233, 2004 (**Anexo 10**).

SANTOS, R. L., BEVINS, C. L., ADAMS, L. G., RAFFATELLU, M., TÜKEL, Ç., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in Microbiology*, v. 17, p. 498-506, 2009 (**Anexo 11**).

REIS, B. P., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G., SANTOS, R. L. The attenuated *sopB* mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium has the same tissue distribution and host chemokine response as the wild type in bovine Peyer's patches. *Veterinary Microbiology*, v.97, p.269-277, 2003 (**Anexo 12**).

SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BAUMLER, A. J., SMITH III, R., ADAMS, L. G. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by an early *sipB*-dependent and a delayed *sipB*-independent mechanism. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 4, p. 2293-2301, 2001b (**Anexo 13**).

SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., ZHANG, S., FICHT, T. A., BAUMLER, A. J., ADAMS, L. G. *Salmonella*-induced cell death is not required for enteritis in calves. *Infection and Immunity*, v.69, n.7, p. 4610-4617, 2001c (**Anexo 14**).

ZHANG, S., SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., MIROLD, S., HARDT W. D., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. Phage mediated horizontal transfer of the *sopE1* gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. *FEMS Microbiology Letters*, V.217, n.2, p.243-247, 2002a (**Anexo 15**).

ZHANG, S., SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., STENDER, S., HARDT, W. D., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium

effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and Immunity*, v.70, n.7, p.3843-3855, 2002b (**Anexo 16**).

SANTOS, R. L., SCHOFFELMEER, J. A., TSOLIS, R. M., GUTIÉRREZ-PABELLO, J. A. G., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. *Salmonella typhimurium* infection of bovine Peyer's patches downregulates plasma membrane calcium transporting ATPase expression. *Journal of Infectious Disease*, v.186, n.3, p.372-378, 2002a (**Anexo 17**).

KINGSLEY, R. A., **SANTOS, R. L.**, KEESTRA, A. M., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding-protein that is expressed in the intestine. *Molecular Microbiology*, v.43, n.4, p.895-905, 2002 (**Anexo 18**).

SANTOS, R. L., ALMEIDA, A. P., XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., WILSON, R. P., DANDEKAR, S., RAFFATELLU, M., BÄUMLER, A. J. Enteric pathology and *Salmonella*-induced cell death in healthy and SIV-infected rhesus macaques. *Veterinary Pathology*, 2011. No prelo (**Anexo 19**).

RAFFATELLU, M., **SANTOS, R. L.**, CHESSA, D., WILSON, R. P., WINTER, S. E., ROSSETTI, C. A., LAWHON, S. D., CHU, H., LAU, T., BEVINS, C. L., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. The presence of the *viaB* locus reduces IL-17 and CXC chemokine expression in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infection and Immunity*, v.75, p.4342-4350, 2007 (**Anexo 20**).

SANTOS, R. L., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Veterinary Pathology*, v.39, n.2, p. 200-215, 2002b (**Anexo 21**).

SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. Hematologic and serum biochemical changes in *Salmonella* ser Typhimurium-infected calves. *American Journal of Veterinary Research*, v.63, n.8, p.1145-1150, 2002c (**Anexo 22**).

ALVES, G. E. S., HARTSFIELD, S. M., CARROLL, G. L., SANTOS, D. A. M. L., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G., **SANTOS, R. L.** Emprego do propofol, isoflurano e morfina para a anestesia geral de longa duração em bezerros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.4, p.411-420, 2003 (**Anexo 23**).

RAFFATELLU, M., GEORGE, M. D., AKIYAMA, Y., HORNSBY, M. J., NUCCIO, S. P., PAIXÃO, T. A., CHU, H., **SANTOS, R. L.**, BERGER, T., MAK, T. W., TSOLIS, R. M., BEVINS, C. L., SOLNICK, J., DANDEKAR, S., BÄUMLER, A. J. Lipocalin-2 resistance of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium is an adaptation to life in the inflamed intestine. *Cell Host & Microbe*, v.5, p.476-486, 2009 (**Anexo 24**).

GODINEZ, I., HANEDA, T., RAFFATELLU, M., PAIXÃO, T. A., ROLÁN, H. G., **SANTOS, R. L.**, GEORGE, M. D., DANDEKAR, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica*

serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infection and Immunity*, v.76, p. 2008-2017, 2008 (**Anexo 25**).

GODINEZ, I., RAFFATELLU, M., CHU, H., PAIXÃO, T. A., HANEDA, T., **SANTOS, R. L.**, BEVINS, C. L., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J. IL-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infection and Immunity*, v.77, p.387-398, 2009 (**Anexo 26**).

TSOLIS, R. M., XAVIER, M. N., **SANTOS, R. L.**, BAUMLER, A. J. How to become a top model: The impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infection and Immunity*, 2011. No prelo (**Anexo 27**).

RAFFATELLU, M., **SANTOS, R. L.**, VERHOEVEN, D., WILSON, R. P., WINTER, S. E., GODINEZ, I., SANKARAN, S., PAIXÃO, T. A., GEORGE, M. D., GORDON, M. A., KOLLS, J., DANDEKAR, S., BÄUMLER, A. J. IL-17 orchestrates a mucosal response against *Salmonella* dissemination from the gut. *Nature Medicine*, v.14, p.421-428, 2008 (**Anexo 28**).

ROUX, C. M., BUTLER, B. P., CHAU, J. Y., PAIXÃO, T. A., CHEUNG, K. W., **SANTOS, R. L.**, LUCKHART, S., TSOLIS, R. M. Both hemolytic anemia and malaria parasite-specific factors increase susceptibility to non-typhoidal *Salmonella* infection in mice. *Infection and Immunity*, v.78, p.1520-1527, 2010 (**Anexo 29**).

SANTOS, R. L., ADAMS, L. G. Bactérias ‘aproveitadoras’. Funções das próprias células infectadas são usadas para favorecer doenças. *Ciência Hoje*. v.29, n. 172, p. 64-66, 2001 (**Anexo 30**).

SANTOS, R. L., PAIXÃO, T. A., BÄUMLER, A. J. Revelado mecanismo que facilita invasão de bactérias em pacientes de AIDS. *Ciência Hoje*, v. 43, p.69-71, 2008b (**Anexo 31**).

CAPÍTULO 3. IMUNIDADE INATA, PATOGÊNESE E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *BRUCELLA* SP.

3.1. Brucelose

Diversos aspectos da brucelose encontram-se amplamente discutidos em nossos artigos de revisão sobre o assunto (CARVALHO NETA et al., 2005 e 2010 [Anexos 32 e 33]; SANTOS et al., 2005a/b [Anexos 34 e 35]; SILVA et al., 2005 [Anexo 36]; PAIXÃO et al., 2009a [Anexo 37]; XAVIER et al., 2009a e 2010a [Anexo 38 e 39]), que subsidiaram a redação deste Capítulo. A seguir apresentamos uma breve introdução sobre a doença.

O termo brucelose se refere à doença causada pela infecção por organismos do gênero *Brucella*, que são cocobacilos Gram negativos pertencentes a família α 2-Proteobacteriaceae (GARRITY, 2001). A brucelose foi inicialmente diagnosticada por David Bruce em 1887 na ilha de Malta, quando foi isolado o organismo inicialmente denominado *Micrococcus melitensis*, de um soldado portador da doença então conhecida como Febre de Malta. Logo em seguida, a doença teve sua natureza zoonótica descoberta por Themistocles Zammit, também do grupo do Dr. Bruce, que demonstrou que a infecção humana era resultado da ingestão de leite e produtos lácteos de cabras infectadas (NICOLETTI, 2002; SANTOS et al., 2005a [Anexo 34]). Contudo, estudos do grupo do Dr. Luigi Capasso têm relatado evidências de que a brucelose é uma doença muito antiga, possivelmente tendo afetado populações mediterrâneas há dois milênios atrás (CAPASSO, 2002). Há até mesmo evidências da infecção em um esqueleto de homínido *Australopithecus africanus*, que viveu há mais de dois milhões

de anos (D'ANASTASIO et al., 2009), embora este trabalho seja fortemente especulativo na nossa interpretação.

Conforme mencionado acima, a brucelose é uma doença zoonótica, sendo considerada a zoonose de maior importância em todo o mundo (TRUJILLO et al., 1994; PAPPAS et al., 2006). Embora o leitor possa ficar induzido a pensar em uma única doença específica, o termo designa diversas enfermidades diferentes, dependendo das espécies do patógeno e do hospedeiro envolvidas (Tabela 1). Existem seis espécies clássicas de *Brucella* spp., das quais quatro tem potencial zoonótico, i.e. *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus* e *Brucella canis*, sendo que o potencial zoonótico destas espécies varia significativamente (Tabela 1), enquanto *Brucella ovis* e *Brucella neotomae* não causam doença no homem (XAVIER et al., 2009a [Anexo 38]). Cabe ressaltar que o gênero *Brucella* tem expandido rapidamente nos últimos anos, com a inclusão de isolados marinhos em duas novas espécies, *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, que infectam cetáceos e pinípedes, respectivamente (FOSTER et al., 2007). Também foi isolada recentemente a *Brucella microti* do roedor *Microtus arvalis* (SCHOLZ et al., 2008) e a *Brucella inopinata*, inicialmente isolada de implantes mamários (SCHOLZ et al., 2010). Além destas espécies, foi isolada recentemente uma nova espécie, ainda não classificada de um babuíno gestante (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009).

Embora as espécies de *Brucella* spp. tenham preferências bastante específica em relação às suas espécies de hospedeiros e causem doenças com manifestações clínicas diversas, a variabilidade genética dentro do gênero é mínima. Para efeito de comparação, há maior variabilidade genética entre sorotipos de *Salmonella enterica* do que entre espécies de *Brucella* (TSOLIS, 2002).

Tabela 1. Hospedeiros preferenciais e potencial zoonótico das espécies de *Brucella*.*

Espécie	Hospedeiro preferencial	Potencial zoonótico
<i>Brucella melitensis</i>	Ovino, caprino	+++
<i>Brucella abortus</i>	Bovino	++
<i>Brucella suis</i>	Suíno	++
<i>Brucella canis</i>	Cão	+
<i>Brucella ovis</i>	Ovino	—
<i>Brucella neotomae</i>	Rato do deserto (<i>Neotomae lepida</i>)	—
<i>Brucella ceti</i>	Cetáceos (golfinhos, baleias)	+
<i>Brucella pinnipedialis</i>	Pinípedes (focas)	+
<i>Brucella microti</i>	Rato silvestre (<i>Microtus arvalis</i>)	—
<i>Brucella inopinata</i>	Desconhecido	+++**

* Adaptado de XAVIER et al., 2009a e 2010a (Anexos 38 e 39).

** Os dois relatos de isolamento de *Brucella inopinata* foram de pacientes humanos (SCHOLZ et al., 2010; TILLER et al., 2010).

A *B. melitensis* é considerada exótica no Brasil, mas a brucelose bovina por *B. abortus* tem grande importância no país (POESTER et al., 2002), com prevalência que atinge 50% em algumas regiões com intensa atividade pecuária. Detalhes sobre a situação epidemiológica podem ser obtidos no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Volume 61, Suplemento 1, 2009), que publicou um suplemento inteiramente dedicado a epidemiologia de brucelose bovina no Brasil. Em estudo recente, onde realizamos levantamento retrospectivo de agentes infecciosos

causadores de aborto em tecidos de fetos bovinos abortados, observamos que a *Brucella* foi o agente identificado com maior frequência, tanto em tecidos congelados de fetos abortados recentemente, quanto em tecidos parafinizados de fetos abortados a várias décadas (SILVA et al., 2009a [Anexo 40]). Vários trabalhos também indicam prevalência relativamente elevada de brucelose ovina por *B. ovis* (SANTOS et al., 2005b [Anexo 35]). A *B. suis* tem pouca importância para a suinocultura tecnificada no Brasil, ficando restrita a criações com condições sanitárias precárias (CARVALHO NETA et al., 2005 [Anexo 32]). Ainda sobre o aspecto epidemiológico, existem evidências de ampla distribuição da *B. canis* no Brasil (MIRANDA et al., 2005).

A doença no homem tem manifestação clínica bastante variável (SANTOS et al., 2005a [Anexo 34]). Abaixo serão detalhadas algumas características clínicas e patológicas da brucelose bovina causada por *B. abortus* e da brucelose ovina causada por *B. ovis*, uma vez que estes são os tópicos mais importantes de pesquisa do nosso grupo, que também tem tangencialmente realizado alguns trabalhos com *B. melitensis*.

A manifestação clínica mais comum da brucelose bovina é a ocorrência de aborto no terço final de gestação, além de natimortalidade e nascimento de bezerros fracos com elevada taxa de letalidade pós-natal (SILVA et al., 2005 [Anexo 36]; XAVIER et al., 2010b [Anexo 41]). Apesar das lesões da brucelose bovina serem relativamente bem conhecidas (NASCIMENTO & SANTOS, 2003), recentemente publicamos um trabalho descrevendo detalhadamente as lesões e a distribuição de *B. abortus* por imunoistoquímica e bacteriologia em vacas e fetos abortados em casos de infecção experimental (XAVIER et al., 2010b [Anexo 41]). Esta infecção experimental foi motivada pela necessidade de avaliação experimental da amostra vacinal RB51 no Brasil, projeto desenvolvido sob a coordenação do Dr. Andrey P. Lage (POESTER et

al., 2006 [Anexo 42]). A lesão mais comum na vaca gestante infectada com *B. abortus* é placentite necrotizante e neutrofílica aguda, associada a grande número de organismos intralesionais (Figuras 5 e 6). Os placentomos são afetados de forma desigual, apresentando-se alguns completamente necrotizados, enquanto outros estão normais. Outra lesão importante, embora discreta ao ponto de somente ser observada microscopicamente, é a mastite intersticial histiocitária com *B. abortus* intralesional. Esta lesão é significativa devido a importância do leite e produtos lácteos como fonte de infecção para o homem. Nos fetos abortados, as principais alterações macroscópicas são pleurite fibrinosa difusa e acentuada, que pode estar associada à pneumonia, pericardite fibrinosa acentuada (Figura 6) e peritonite fibrinosa geralmente discreta. Geralmente, nem todas as lesões são observadas em um único feto e alguns fetos podem não apresentar nenhuma alteração macroscópica. No touro, a principal manifestação da infecção por *B. abortus* é orquite e epididimite (NASCIMENTO & SANTOS, 2003).

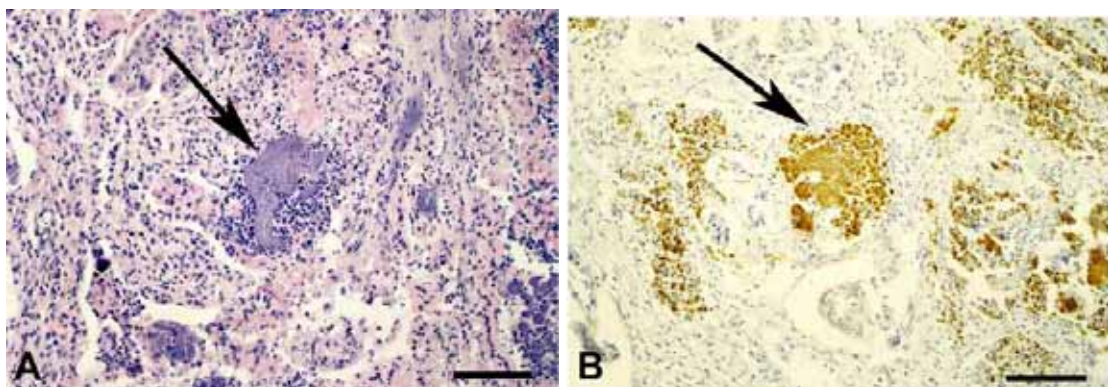


Figura 5. (A) Placentite necrotizante aguda com grumos bacterianos intralesionais em vaca com aborto causado por *Brucella abortus* e (B) imunomarcação de *Brucella* sp. em corte seriado de A (Fonte: CARVALHO NETA et al., 2010 [Anexo 33]).

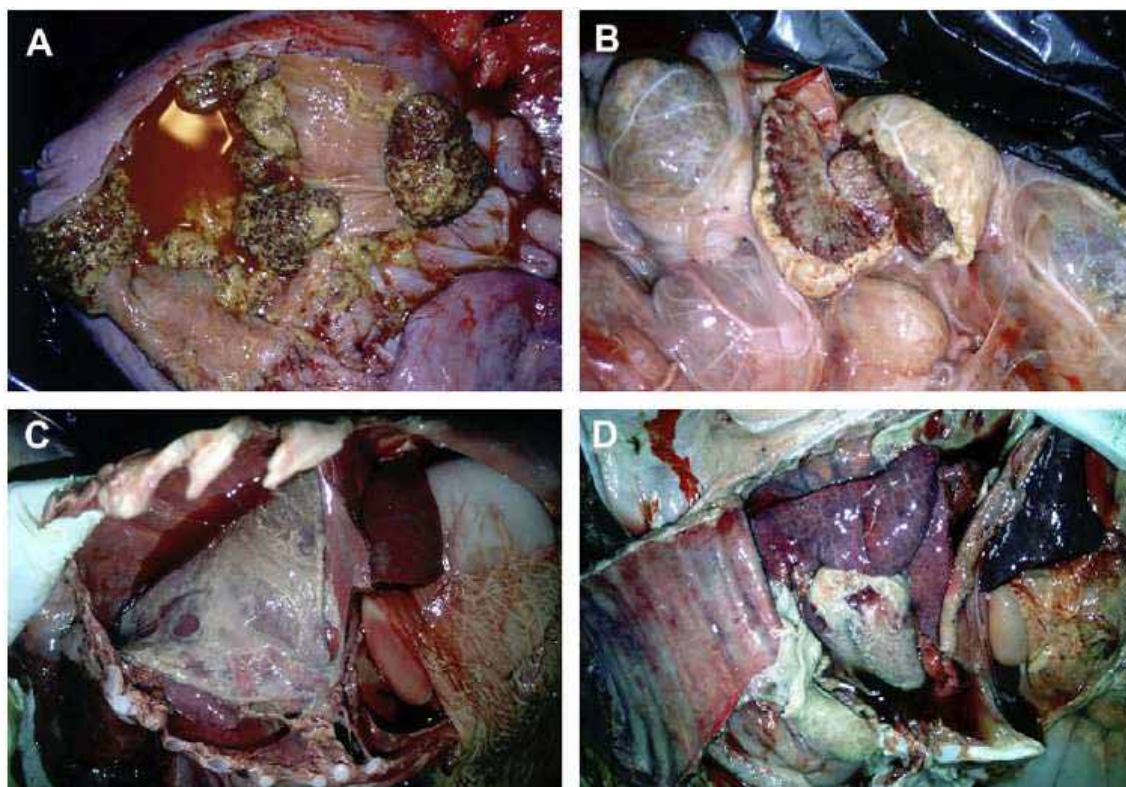


Figura 6. Brucelose bovina por *Brucella abortus*. (A) útero contendo exsudato fibrinoso após aborto. (B) Superfície de corte de placentomo com exsudato fibrinoso e necótico e hemorragia multifocal (placentite necrotizante). (C) Feto abortado com exsudato fibrinoso na superfície pleural (pelurite fibrinosa). (D) Feto abortado com saco pericárdico preenchido por exsudato fibrinoso (pericardite fibrinosa). (Fonte: XAVIER et al., 2009b [Anexo 41])

Em marcante contraste com o observado na brucelose bovina, a ocorrência de abortos é apenas esporádica na brucelose ovina por *B. ovis* (SANTOS et al., 2005b [Anexo 35]; XAVIER et al., 2009a [Anexo 38]). A principal manifestação da infecção por *B. ovis* ocorre nos machos e é caracterizada primariamente por epididimite em carneiros sexualmente maduros, sendo considerada uma das principais causas de infertilidade em carneiros (CARVALHO JR., et al., 2010). Recentemente realizamos infecção experimental de carneiros com *B. ovis* visando o desenvolvimento de um

método de diagnóstico que será discutido abaixo (XAVIER et al., 2010b [Anexo 43]), mas que teve os aspectos andrológicos e anátomo-histopatológicos incluídos em uma dissertação de mestrado (CARVALHO JR., 2010), cujos resultados ainda não foram publicados. Clinicamente, a cauda do epidídimo é afetada com maior frequência, sendo observada assimetria da cauda do epidídimo. A infecção por *B. ovis* está associada a vacuolização intra-epitelial do epitélio do ducto epididimário, com focos de hiperplasia epitelial (Figura 7), infiltrado inflamatório histiocitário intersticial e, em casos graves, extravasamento de espermatozóides para o interstício e formação de granuloma espermático (Figura 7). Os carneiros infectados também frequentemente desenvolvem vesiculite seminal. Estas alterações resultam em perda de qualidade espermática, caracterizada por diminuição da concentração espermática e aumento da frequência de anormalidades espermáticas, frequentemente associadas à eliminação de neutrófilos no sêmen (Figura 7). Contudo, a maior parte dos carneiros infectados são assintomáticos, embora possam ter comprometimento de sua fertilidade. Os carneiros infectados frequentemente eliminam *B. ovis* no sêmen, embora, na maioria dos casos, de forma intermitente (XAVIER et al., 2010b [Anexo 43]). Um estudo realizado recentemente por nosso grupo demonstrou que o organismo pode ser inativado pela adição de antibióticos adequados ao diluidor utilizado para inseminação artificial (MOUSTACAS et al., 2010 [Anexo 44]).

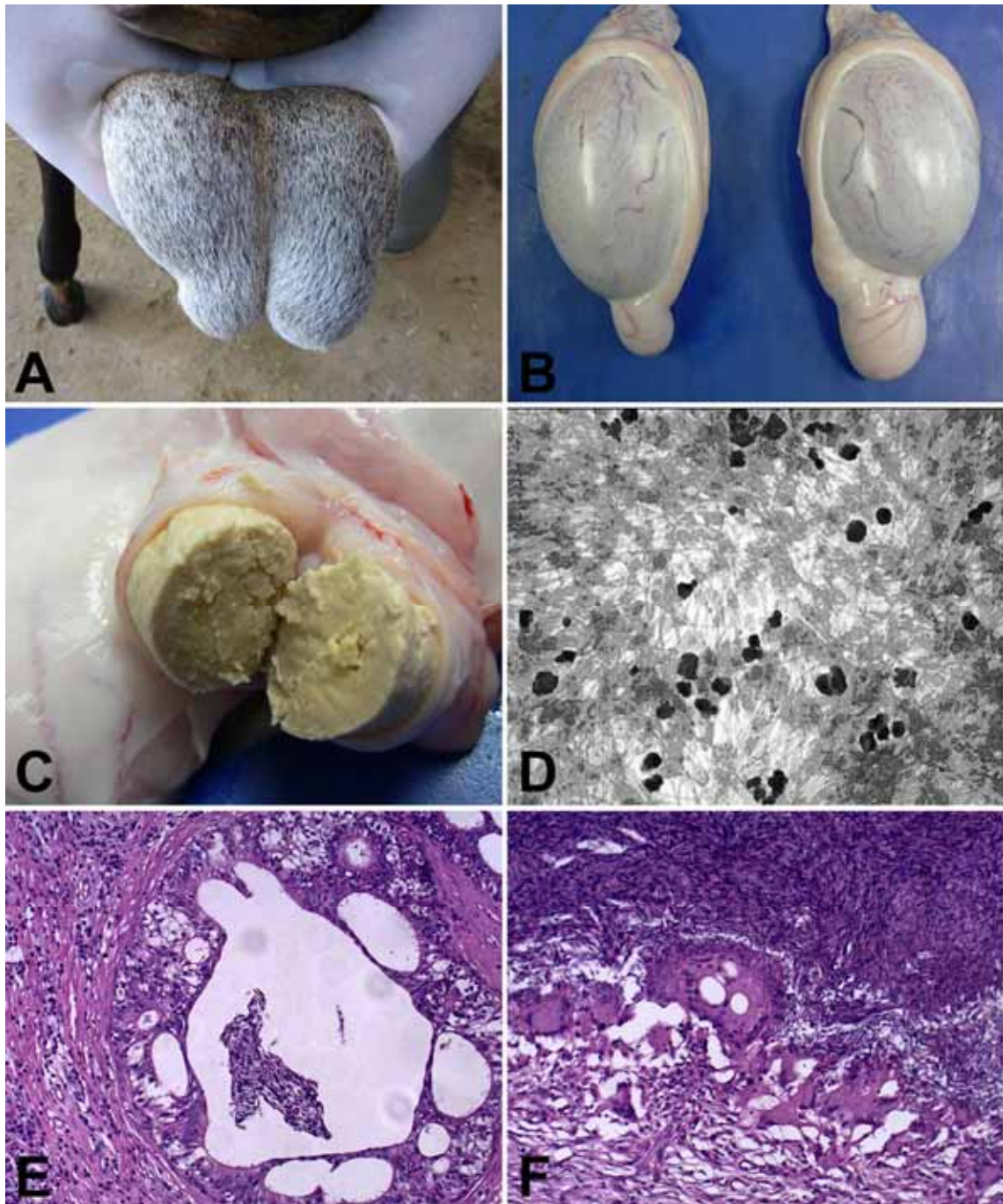


Figura 7. Brucelose ovina por *Brucella ovis*. (A) Assimetria da cauda do epidídimo. (B) Assimetria da cauda do epidídimo devido à epididimite unilateral do lado direito. (C) Superfície de corte de um granuloma espermático na cauda do epidídimo. (D) Grande quantidade de neutrófilos no ejaculado. (E) Ducto epididimário com hiperplasia e vacuolização (cistos intraepiteliais) e infiltrado inflamatório intersticial. (F) Granuloma espermático.

3.2. Interação patógeno-hospedeiro: patogênese e imunidade inata

A *Brucella* é um patógeno intracelular facultativo, sendo sua capacidade de sobrevivência intracelular um aspecto fundamental para patogenicidade. A infecção por *Brucella* spp. se dá, na maioria dos casos, por ingestão de material contaminado, inclusive na brucelose bovina, cujas principais fontes de infecção são fetos abortados, restos placentários e secreção vulvar (SILVA et al., 2005 [Anexo 36]), embora outras vias de infecção sejam bem documentadas, e.g. a transmissão por aerossol (HARTIGAN, 1997). Em um de nossos estudos recentes, Tatiane Paixão desenvolveu um modelo de infecção gastro-intestinal por *B. melitensis* em camundongos. Neste estudo, foi possível demonstrar que a invasão intestinal por *B. melitensis* ocorre principalmente através das células M das placas de Peyer. Outro aspecto extremamente interessante deste estudo é o fato de que a invasão gastro-intestinal pela *B. melitensis* praticamente não elicitava nenhuma resposta do hospedeiro, ocorrendo de forma absolutamente silenciosa (PAIXÃO et al., 2009b [Anexo 45]). Estes resultados estão em consonância com estudos no nosso (CARVALHO NETA et al., 2008 [Anexo 46]) e de outros grupos (BARQUERO-CALVO et al., 2007; SALCEDO et al., 2008), que tem demonstrado que a *Brucella* sp. tem capacidade de interferir ativamente com a resposta imune, conforme será detalhado abaixo. Neste estudo, foram também identificados fatores de virulência requeridos para invasão por via gastro-intestinal, incluindo urease, o sistema de secreção do tipo IV (SST4) e o LPS. Além dos experimentos com infecção *in vivo*, PAIXÃO et al. (2009b [Anexo 45]) utilizou cultivo celular para, de uma forma simples mas muito elegante, demonstrar que as células M são a porta de entrada para *B. melitensis*. Ao infectar monocamada de células epiteliais intestinais, não houve

translocação do patógeno para o compartimento baso-lateral, mas quando as células epiteliais intestinais foram co-cultivadas com células Raji B, que induzem a diferenciação de enterócitos em células M, a monocamada passou a ser permissiva a translocação do patógeno (Figura 8).

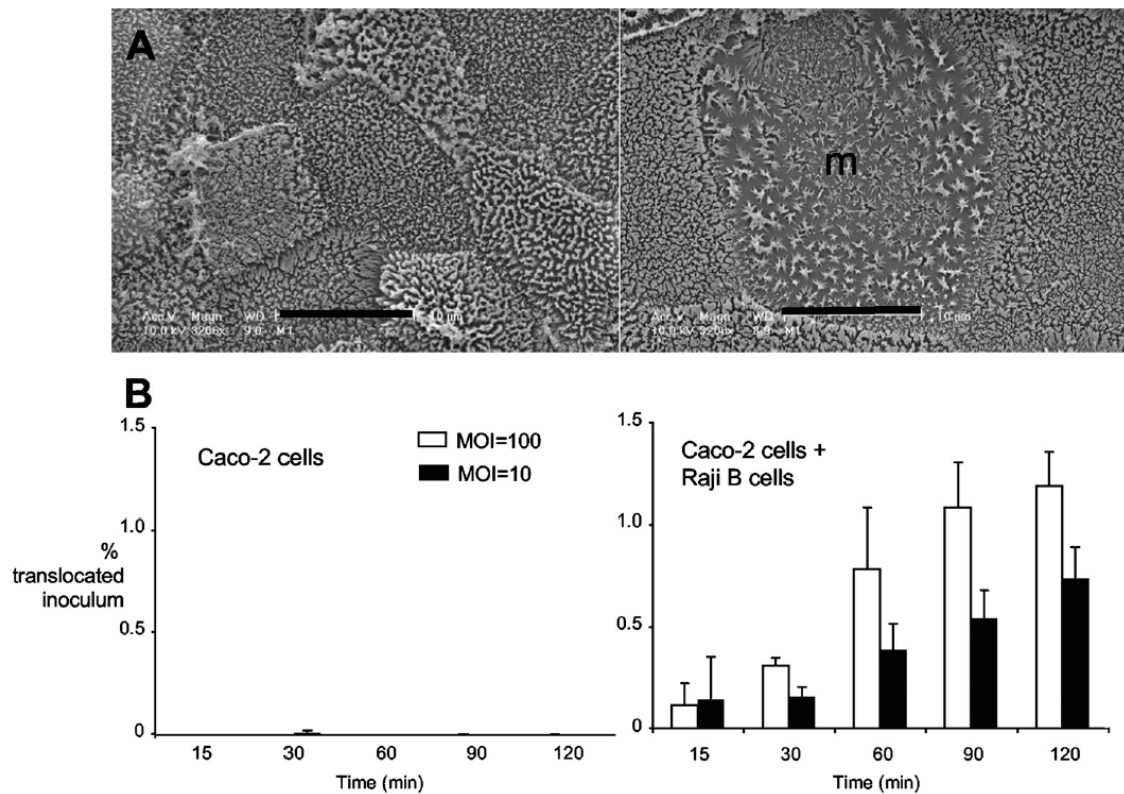


Figura 8. (A) Microscopia eletrônica de varredura da superfície apical de uma monocamada de células Caco-2 (esquerda) e Caco-2 em co-cultura com Raji B (direita), onde se observam células M (m). (B) Trasloção de *Brucella melitensis* nas monocamadas da Caco-1 ao longo do tempo após inoculação, com ou sem co-cultura com Raji B (esquerda e direita, respectivamente). Fonte: PAIXÃO et al., 2009b (Anexo 45).

Uma vez atravessada a barreira epitelial, *Brucella* spp. é fagocitada por fagócitos residentes da lamina própria (ACKERMANN et al.,1998). Embora os macrófagos tenham como principal função a fagocitose e eliminação de agentes invasores e

apresentação de antígenos, estas células são permissivas a multiplicação intracelular de *Brucella* spp. A interação de *Brucella* spp. com macrófagos e, particularmente a resposta destas células à infecção, encontra-se detalhada em um dos nossos trabalhos recentes de revisão (PAIXÃO et al., 2009a [Anexo 37]). Uma série de estudos, com destaque aqui para a contribuição do grupo de Jean Pierre Gorvel (CELLI et al., 2003), demonstraram que a *Brucella* spp. têm a capacidade de alterar o tráfego intracelular, de forma que o vacúolo contendo o patógeno desvia da degradação lisossomal, direcionando-se para a aquisição de membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), onde o patógeno encontra seu nicho intracelular ideal para replicação. Este mecanismo é fortemente dependente do SST4 codificado pelo operon *virB* (CELLI et al., 2003), conservado em todas as espécies de *Brucella*. Este SST4 é absolutamente essencial para persistência *in vivo* (HONG et al., 2000) e sobrevivência intracelular *in vitro* (O'CALLAGHAN et al., 1999; FOULONGNE et al., 2000; SIEIRA et al., 2000). Para melhor compreensão do SST4 de *Brucella* spp., o autor pode consultar artigo de revisão recente por DE JONG et al. (2010). Ao contrário de outros patógenos bacterianos com capacidade de sobrevivência intracelular em macrófagos, e.g. *Salmonella enterica*, a sobrevivência intracelular no caso da *Brucella* spp. não é dependente de evasão da oxidase NADPH e da iNOS, ou seja, o SST4 não interfere com a explosão respiratória ou produção de óxido nítrico, que são mecanismos bactericidas importantes do macrófago (SUN et al., 2002 [Anexo 47]). Estes resultados suportam a hipótese de que *Brucella* spp. evade estes sistemas bactericidas do macrófago por sua localização (*virB*-dependente) em um sítio intracelular privilegiado que tem características de RER (CELLI et al., 2003).

Em um dos nossos trabalhos, realizado no laboratório da Dra. Renée Tsolis, no qual ROUX et al. (2007 [Anexo 48]) realizaram análise transcriptômica *in vivo* durante a infecção por *B. abortus* e *B. melitensis* em camundongos, demonstrou-se que *Brucella* spp. induz uma resposta pró-inflamatória na fase inicial da infecção e que esta resposta é praticamente ausente quando os animais são infectados com amostras sem SST4 funcional (mutantes *virB*) nas mesmas condições experimentais. Além de essencial para o desencadeamento de resposta imunológica do hospedeiro, o SST4 também é essencial para a formação de microgranulomas no baço, que é o sítio de persistência da *Brucella* sp. Esta última informação foi obtida associando-se ferramentas camundongo knockout associado a mutagênese do patógeno, com métodos tradicionais de morfometria (ROLÁN et al., 2009 [Anexo 49]).

Outra célula-alvo extremamente importante é a célula trofoblástica da placenta (MEADOR & DEYOE, 1989; XAVIER et al., 2009b [Anexo 41]). Luis Samartino, durante seu doutoramento na Louisiana (EUA), desenvolveu um método de cultivo de explantes de placenta bovina que permitiram a inoculação experimental de células trofoblásticas (SAMARTINO & ENRIGHT, 1992). Utilizamos este modelo para realização de um estudo de análise transcriptômica de células trofoblásticas bovinas infectadas com *B. abortus* (CARVALHO NETA et al., 2008 [Anexo 46]). Neste estudo, observamos que ocorre supressão de resposta pró-inflamatória durante as primeiras horas de interação de *B. abortus* com células trofoblásticas bovinas. Somente tardiamente, ocorre a expressão de algumas quimiocinas pró-inflamatórias, i.e. IL-8 (CXCL8) e GCP-2 (CXCL6), que também são expressas na placenta bovina *in vivo* durante a infecção e placentite induzida por *B. abortus* (CARVALHO NETA et al., 2008 [Anexo 46]). Atualmente, continuamos utilizando este modelo para melhor

compreensão do papel de fatores de virulência da *B. abortus* em células trofoblásticas. Além disso, nosso grupo tem investigado a expressão de receptores de padrões moleculares de patógenos nos diversos componentes do útero gestante, com dados ainda não publicados, e no período pós-parto (MARTINS et al., 2011 [Anexo 50]), o que deve nos dar subsídio para melhor compreensão da imunidade inata do útero gestante e puerperal.

A resistência natural contra patógenos intracelulares, inclusive *Brucella* spp., tem sido bastante estudada e foi abordada em alguns dos nossos trabalhos. A resistência natural pode ser definida como a capacidade do hospedeiro de resistir à doença quando exposto ao agente, sem vacinação ou contato prévio com o agente (TEMPLETON et al., 1988). Um dos genes envolvidos em resistência natural foi identificado em camundongos e, posteriormente, foram identificados ortólogos no homem e nas espécies de animais domésticos. Estudos independentes levaram a identificação de genes envolvidos na resistência natural contra *Mycobacterium bovis*, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Leishmania donovani* (BRADLEY et al., 1979; GROS et al., 1981; LISSNER et al., 1983). Posteriormente, verificou-se tratar de um único locus identificado como *Nramp1* (*natural resistance associated macrophage protein 1*), recentemente renomeado como *Slc11a1* (*solute carrier family 11 member 1*), associado a atividade antimicrobiana de macrófagos contra patógenos intra-celulares (VIDAL et al., 1995). A proteína Nramp1 é um transportador de cátions divalentes localizado na membrana do fago-lisossomo (GRUENHEID et al., 1997). Estudos do grupo do Dr. Garry Adams, utilizando cruzamento e seleção de bovinos, resultou na identificação de animais geneticamente resistentes a *B. abortus*, que genotipicamente apresentavam um dado alelo da região 3'UTR do gene *Nramp1* (ADAMS & TEMPLETON, 1998). Este

genótipo também foi correlacionado com a capacidade do macrófago de prevenir a multiplicação intracelular de *B. abortus* (PRICE et al., 1990; QURESHI et al., 1996). Portanto, considerando-se a possibilidade da utilização deste polimorfismo da região 3'UTR do gene *Nramp1* bovino como marcador de resistência a brucelose em condições de campo, realizamos um levantamento criterioso da frequência de genótipos em algumas das principais raças do Brasil, incluindo-se *Bos taurus taurus* (Holandês) e *Bos taurus indicus* (Nelore, Gir e Guzerá). Este estudo demonstrou homogeneidade nos genótipos de bovinos da raça Holandesa no Brasil e variabilidade marcante em zebuínos (PAIXÃO et al., 2006 [Anexo 51]). Estes resultados estimularam o grupo a desenvolver um projeto para investigar diferenças na resposta imune inata de macrófagos das raças zebuínas e taurinas durante a infecção por *Brucella*, que se encontra em desenvolvimento e com resultados preliminares extremamente interessantes e ainda não publicados. Após o trabalho de PAIXÃO et al. (2006 [Anexo 51]), o próximo passo foi a realização de um estudo abrangente, incluindo infecção natural a campo, infecção experimental e estudo de sobrevivência intracelular em macrófagos (PAIXÃO et al., 2007 [Anexo 52]), que demonstrou de forma inequívoca que este polimorfismo da região 3'UTR do gene *Nramp1* não tem potencial como marcador a campo (PAIXÃO et al., 2007 [Anexo 52]). Atualmente estamos em colaboração com o Dr. Rodrigo Martinez (CORPOICA, Colômbia) com alguns resultados promissores e ainda não publicados.

Os estudos sobre a patogênese de *B. ovis* tem sido bastante limitados. Contudo, tendo em vista a grande similaridade genética entre as espécies do gênero *Brucella* (TSOLIS, 2002), é possível fazer extrapolações de uma espécie para outra com grandes possibilidades de acerto. Portanto, a maior parte dos aspectos relacionados à patogênese

de *Brucella* spp. discutidos acima se aplicam a *B. ovis*. Contudo, apesar da similaridade genética entre *B. melitensis* e *B. ovis*, a primeira é altamente patogênica para o homem, com apenas alguns poucos organismos viáveis sendo suficientes para desencadear uma doença crônica e debilitante em humanos, enquanto *B. ovis* não tem nenhum potencial zoonótico. Este foi um dos aspectos que nos motivaram a realizar a análise da sequência genômica completa de *B. ovis* (TSOLIS et al., 2009 [Anexo 53]). Este estudo resultou na identificação de uma sequência genômica específica de *B. ovis*, i.e. ausente na sequência genômica das demais espécies clássicas de *Brucella*. Esta sequência contém 28 ORFs (do inglês, *open reading frame*) entre os quais alguns genes presumivelmente codificadores de um sistema transportador do tipo ABC (do inglês, *ATP-binding cassette*). Considerando-se a hipótese de que estes genes estão envolvidos na patogênese de *B. ovis*, em uma dissertação de mestrado (SILVA, 2010), realizamos mutagênese em dois destes genes ($\Delta abcAB$), além da mutagênese de um gene presumivelmente codificador de uma hemaglutinina (Δhmg) (Figura 9). Após a caracterização detalhada de um modelo murino para a infecção por *B. ovis*, estes mutantes foram avaliados no modelo murino. Enquanto o mutante Δhmg apresentou fenótipo idêntico à cepa de referência, o mutante $\Delta abcAB$ apresentou forte atenuação no modelo murino, bem como em linhagens celulares de macrófagos murinos. Além disso, apesar de a amostra de referência resultar em 100% de letalidade em camundongos imunodeficientes (*knockouts* para IRF-1, que apresentam defeito na resposta mediada por IFN- γ), a cepa mutante $\Delta abcAB$ não resultou em letalidade (100% de sobrevivência) nas mesmas condições experimentais (SILVA et al., 2011 [Anexo 54]). Portanto, neste estudo pudemos identificar um fator de virulência essencial para *B. ovis* no modelo murino. Por isso, propusemos no trabalho de SILVA et al. (2011; [Anexo 54]) a

denominação de *B. ovis-pathogenicity island 1* (BOPI-1), para o segmento genômico específico de *B. ovis* identificado por TSOLIS et al. (2009; [Anexo 53]).

Tendo em vista a ausência de vacina para *B. ovis* disponível no Brasil, esta cepa mutante $\Delta abcAB$ tem potencial como amostra vacinal, tendo sido portanto depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) pedido de patente para proteção do direito à propriedade intelectual desta cepa. Nesta etapa estamos avaliando o efeito patogênico residual da cepa $\Delta abcAB$ bem como seu potencial imunogênico em carneiros sexualmente maduros. Além disso, estamos avaliando o potencial uso da proteína codificada pelo gene *hmg* como antígeno para provas sorológicas. Caso tal proteína tenha de fato potencial como antígeno, isso abriria a possibilidade de construção de uma nova cepa vacinal duplo mutante $\Delta abcAB$ e Δhmg , que seria passível de diferenciação em prova sorológica de infecção natural por amostras de campo.

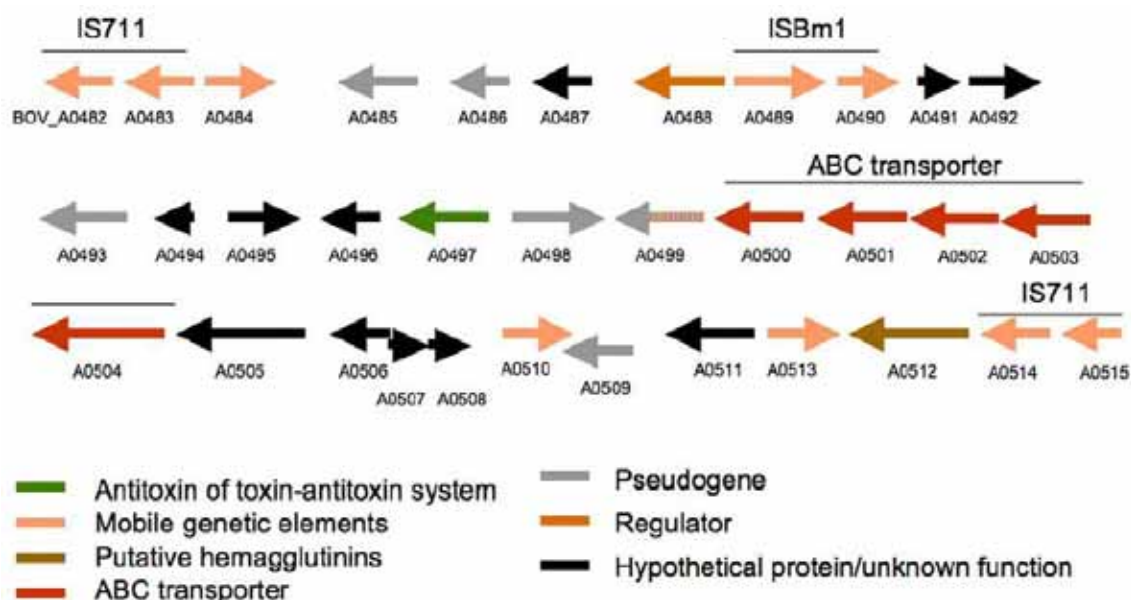


Figura 9. Representação esquemática de BOPI-1 (*B. ovis-pathogenicity island 1*) com a indicação dos genes codificadores do transportador ABC. O mutante $\Delta abcAB$ foi gerado pela deleção de A0500 e A0501 (Fonte: TSOLIS et al., 2009 [Anexo 53]).

3.3. Diagnóstico da brucelose

Em nossa rotina laboratorial, utilizamos vários métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial de brucelose (ALTON et al., 1988). Como tais métodos não serão discutidos aqui, recomendamos ao leitor interessado a revisão por POESTER et al. (2010), publicado no suplemento especial sobre brucelose, editorado pelo autor deste texto, em *The Open Veterinary Science Journal* (volume 4, suplemento, 2010). Nesta seção, concentraremos em uma breve discussão sobre o primeiro método espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* por PCR.

A BOPI-1, ausente nas espécies clássicas de *Brucella*, foi consistentemente detectada em isolados de campo de várias regiões geográficas, indicando que a BOPI-1 é conservada em *B. ovis* (TSOLIS et al., 2009 [Anexo 53]). Considerando-se que os métodos de PCR até então disponíveis e utilizados para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* em carneiros é gênero-específico (MARTEROLA et al., 2003) e que o diagnóstico específico é extremamente desejável, sobretudo em áreas onde *B. melitensis* (com alto potencial zoonótico) é prevalente, utilizamos alguns ORFs da BOPI-1 como alvo de amplificação para o desenvolvimento de um método espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* (XAVIER et al., 2010b [Anexo 43]). Este método apresenta elevada especificidade, i.e. não amplifica sequências genômicas de nenhuma das espécies clássicas de *Brucella*, nem de outros agentes potencialmente causadores de epididimite em carneiros e nem organismos filogeneticamente próximos a *Brucella*. Além de detectar *B. ovis* em amostras de sêmen, o método tem elevada sensibilidade

com amostras de urina (limite de detecção de 10 UFC/ml), que são de fácil obtenção sob o ponto de vista propedêutico. Tendo em vista a originalidade deste método, o protocolo e potencial kit diagnóstico constituiu um pedido de patente depositado no INPI. Este método foi aplicado em condições de campo com resultados extremamente encorajadores (dados não publicados).

Considerando que o método gênero-específico utilizado por MANTEROLA et al. (2003) tem como alvo de amplificação o elemento *IS711* que conta com várias cópias no genoma de *Brucella* spp., este método teoricamente seria mais sensível do que o método espécie-específico desenvolvido por nosso grupo (XAVIER et al., 2010b [Anexo 43]). Por isso, em colaboração com a Dra. Jane Megid, na dissertação de mestrado de Luciana F. Costa, aperfeiçoamos o método espécie-específico com a introdução de novos pares de iniciadores para a execução de um protocolo *nested* (COSTA, 2010), que resultou em sensibilidade significativamente superior ao protocolo utilizado por MANTEROLA et al. (2003).

3.4. Síntese da contribuição na área de brucelose

Nossos estudos em brucelose têm representado contribuição particularmente para a área de brucelose bovina causada por *B. abortus* e brucelose ovina por *B. ovis*. Nossos projetos geralmente contemplam aspectos básicos da patogenicidade e interação patógeno-hospedeiro, mas também vislumbram possibilidades de aplicação prática na área de diagnóstico ou desenvolvimento de imunógenos, nestes últimos casos resultando em potencial de inovação tecnológica, tendo em vista os pedidos de patente originários desta linha de pesquisa, intitulados: “Método diagnóstico espécie-específico de

Brucella ovis e kit diagnóstico para detecção de *Brucella ovis* através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)” e “Cepa atenuada de *Brucella* sp., composição vacinal e uso”.

A experiência acumulada com esta linha de pesquisa nos permitiu recentemente a elaboração, à convite, de um artigo de revisão sobre modelos experimentais em brucelose que foi aceito para publicação no *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Silva et al., 2011 [Anexo 55]). Cabe salientar que, além dos esforços do grupo para comunicação científica, esta nossa linha de pesquisa tem produzido material direcionado primariamente para veterinários de campo, com no caso do fascículo dos Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia dedicado exclusivamente à brucelose (Número 47, 2005), além de publicações de divulgação para técnicos e criadores como o artigo recentemente publicado na revista Leite Integral (SANTOS, 2009).

Os trabalhos listados abaixo foram utilizados para a estruturação deste Capítulo. Suas separatas foram incluídas na seção de anexos, onde estão disponíveis todos os dados que deram suporte a esta parte do texto.

CARVALHO NETA, A. V., NASCIMENTO, E. F., **SANTOS, R. L.** Brucelose suína. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.57-65, 2005 (**Anexo 32**).

CARVALHO NETA, A. V., MOL, J. P. S., XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., LAGE, A. P., **SANTOS, R. L.** Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, v. 184, p. 146-155, 2010 (**Anexo 33**).

SANTOS, R. L., SILVA, F. L., PAIXÃO, T. A., SAMARTINO, L. E. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.83-98, 2005a (**Anexo 34**).

SANTOS, R. L., POESTER, F. P., LAGE, A. P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.42-56, 2005b (**Anexo 35**).

SILVA, F. L., PAIXÃO, T. A., BORGES, A. M., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Brucelose bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.1-12, 2005 (**Anexo 36**).

PAIXÃO, T. A., COSTA, E. A., XAVIER, M. N., SILVA, T. M. A., SANTOS, R. L. Innate immunity in brucellosis. In: *Research Advances in Infection & Immunity*. Kerala (Índia): Global Research Network, v.1, 2009a, pp. 21-37 (**Anexo 37**).

XAVIER, M. N., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural*, v. 39, p. 2252-2260, 2009a (**Anexo 38**).

XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., DEN HARTIGH, A. B., TSOLIS, R. M., SANTOS, R. L. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Sciences Journal*, v. 4, p. 109-118, 2010a (**Anexo 39**).

SILVA, T. M. A., OLIVEIRA, R. G., MOL, J. P. S., XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., CORTEZ, A., HEINEMANN, M. B., RICHTZENHAIN, L. J., LAGE, A. P., **SANTOS, R. L.** Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Ciência Rural*, v. 39, p. 2563-2570, 2009a (**Anexo 40**).

XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., POESTER, F. P., LAGE, A. P., **SANTOS, R. L.** Pathology, immunohistochemistry, and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *Journal of Comparative Pathology*, v.140, n.3-4, p.147-157, 2009b (**Anexo 41**).

POESTER, F.P., GONÇALVES, V. S. P., PAIXÃO, T. A., **SANTOS, R. L.**, OLSEN, S. O., SCHURIG, G. G., LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, n.25, p.5327-5334, 2006 (**Anexo 42**).

XAVIER, M. N., SILVA, T. M. A., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., MOUSTACAS, V. S., CARVALHO JÚNIOR, C. A., SANT'ANNA, F. M., ROBLES, C. A., GOUVEIA, A. M. G., LAGE, A. P., TSOLIS, R. M., **SANTOS, R. L.** Development and evaluation of a species-specific PCR assay for detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary Microbiology*, v. 145, p. 158-164, 2010b (**Anexo 43**).

MOUSTACAS, V. S., XAVIER, M. N., CARVALHO-JÚNIOR, C. A., COSTA, E. A., HENRY, M., **SANTOS, R. L.** Effect of different antibiotics on viability of *Brucella ovis* and *Actinobacillus seminis* in cryopreserved ovine semen. *Theriogenology*, v. 74, p. 1476-1481, 2010 (**Anexo 44**).

PAIXÃO, T. A., ROUX, C. M., DEN HARTIGH, A. B., SANKARAN-WALTERS, S., DANDEKAR, S., **SANTOS, R. L.**, TSOLIS, R. M. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, v. 77, p. 4197-4208, 2009b (**Anexo 45**).

CARVALHO NETA, A. V., STEYNEN, A. P. R., PAIXÃO, T. A., MIRANDA, K. L., SILVA, F. L., ROUX, C. M., TSOLIS, R. M., EVERTS, R. E., LEWIN, H. A., ADAMS, L. G., CARVALHO, A. F., LAGE, A. P., **SANTOS R. L.** Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, v.76, p. 1897-1907, 2008 (**Anexo 46**).

SUN, Y. H., DEN HARTIGH A. B., **SANTOS, R. L.**, ADAMS, L. G., TSOLIS, R. M. *virB*-mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or macrophage NADPH oxidase in macrophages. *Infection and Immunity*, v.70, n.9, p.4826-4832, 2002 (**Anexo 47**).

ROUX, C. M., ROLÁN, H. G., **SANTOS R. L.**, BEREMAND, P. D., THOMAS, T. L., ADAMS, L. G., TSOLIS, R. M. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cellular Microbiology*, v.9, p.1851-1869, 2007 (**Anexo 48**).

ROLÁN, H. G., XAVIER, M. N., **SANTOS, R. L.**, TSOLIS, R. M. Natural antibody contributes to host defense against an attenuated *Brucella abortus virB* mutant. *Infection and Immunity*, v.77, n.7, p.3004-3013, 2009 (**Anexo 49**).

MARTINS, T. M., PAIXÃO, T.A., COSTA, E. A., PIRES, A.C., **SANTOS, R. L.**, BORGES, Á. M. Postpartum expression of Toll-like receptors and β -defensin 5 in the endometrium of Holstein cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.139, p.277-281, 2011 (**Anexo 50**).

PAIXÃO, T. A., FERREIRA, C., BORGES, A. M., OLIVEIRA, D. A. A., LAGE, A. P., **SANTOS, R. L.** Frequency of bovine Nrampl (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.109, p.37–42, 2006 (**Anexo 51**).

PAIXÃO, T. A., POESTER, F. P., CARVALHO NETA, A. V., BORGES, A. M., LAGE, A. P., **SANTOS, R. L.** *NRAMP1* 3'UTR polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infection and Immunity*. v.75, p. 2493-2499, 2007 (**Anexo 52**).

TSOLIS, R. M., SESHADRI, R., **SANTOS, R. L.**, SANGARI, F. J., GARCÍA LOBO, J. M., REN, Q., MYERS, G., BRINKAC, L., NELSON, W., DEBOY, R., ANGIUOLI, S., KHOURI, H., DIMITROV, G., ROBINSON, J., MULLIGAN, S., DE JONG, M. F., WALKER, R. L., ELZER, P. E., HALLING, S. L., HASSAN, K. A., PAULSEN, I. T.

Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *Plos ONE*, v.4, n.5, e5519, 2009 (**Anexo 53**).

SILVA, T. M. A., PAIXÃO, T. A., COSTA, E. A., XAVIER, M. N., SÁ, J. C., MOUSTACAS, V. S., DEN HARTIGH, A. B., CARVALHO NETA, A. V., OLIVEIRA, S. C., TSOLIS, R. M., **SANTOS, R. L.** Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infection and Immunity*, 2011. No prelo (**Anexo 54**).

SILVA, T. M. A., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., TSOLIS, R. M., **SANTOS, R. L.** Laboratory animal models for brucellosis research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. No prelo (**Anexo 55**).

CAPÍTULO 4. LESÕES GENITAIS E TRANSMISSÃO VENÉREA DE *LEISHMANIA CHAGASI*

4.1. Leishmaniose

A leishmaniose é causada por protozoários da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Estes protozoários apresentam diferentes formas durante seu ciclo de vida. Ocorrem formas móveis, denominadas promastigota e paramastigota, que se desenvolvem no intestino do vetor invertebrado, enquanto a forma imóvel, denominada amastigota (Figura 10), se desenvolve no citoplasma de macrófagos nos hospedeiros vertebrados (KILLICK-KENDRICK, 1990; MAUEL, 1990). O ciclo parasitário de *Leishmania* sp. envolve multiplicação no vetor invertebrado e sua transmissão, através da picada do flebotomíneo, para o hospedeiro vertebrado, na forma infectante de promastigotas metacíclicas (KILLICK-KENDRICK, 1990). As formas promastigotas são então fagocitadas pelos macrófagos transformando-se em amastigotas (KILLICK-KENDRICK, 1990; MAUEL, 1990), que possuem capacidade de sobreviver e replicar intracelularmente (BUENO et al., 2005 [Anexo 56]; BUENO et al., 2009 [Anexo 57]).

Atualmente, há 30 diferentes espécies de flebotomíneos considerados vetores biológicos capazes de transmitir *Leishmania* sp. para os hospedeiros vertebrados susceptíveis (DESJEUX, 1996). Cinco gêneros da subfamília Phlebotominae são encontrados em regiões de clima tropical e subtropical: *Sergentomyia* spp., *Phlebotomus* spp., *Lutzomyia* spp., *Brumptomyia* spp. e *Warileya* spp. (GRIMALIDI JR. et al., 1989). Dentre eles, os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são considerados os principais vetores biológicos para *Leishmania* sp. no Velho Mundo e Novo Mundo, respectivamente

(MARSELLA & GOPEGUI, 1998; DINIZ et al., 2008 [Anexo 58]; SHARMA & SINGH, 2008).

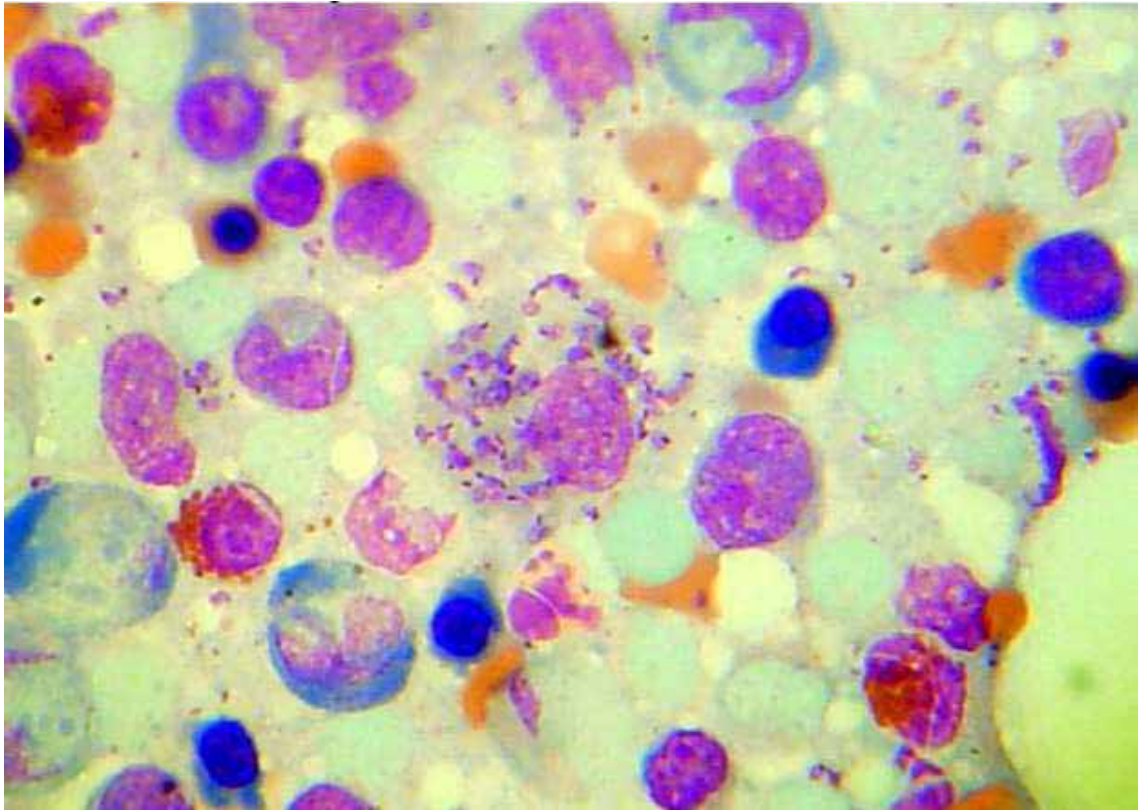


Figura 10. Esfregaço de medula óssea com macrófago contendo inúmeras amastigotas de *Leishmania chagasi* intracitoplasmáticas (Fonte: DINIZ et al., 2008 [Anexo 58]).

A manifestação clínica de leishmaniose varia conforme as espécies de hospedeiro vertebrado e parasita envolvidas. Na espécie humana, ocorrem três formas clínicas distintas: visceral, cutânea e mucosa. Estas manifestações estão associadas à replicação intracitoplasmática de *Leishmania* sp. em macrófagos presentes no tecido linforreticular (baço, fígado, linfonodos), na derme, e mucosa naso-orofaríngeal, respectivamente (ASHFORD, 1997). A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma antroponose causada por espécies de *Leishmania* do complexo donovani

representadas por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no Velho Mundo e *Leishmania chagasi* no Novo Mundo (SHAW, 1994). Embora atualmente *L. infantum* e *L. chagasi* sejam consideradas a mesma espécie (MAURICIO et al., 1999).

A LV é considerada endêmica nas regiões tropical, subtropical e sul da Europa. A sua distribuição tem sido associada à ampla distribuição geográfica de flebotomíneos (DESJEUX, 1996). As mudanças ambientais ocorridas em países subdesenvolvidos têm levado à destruição do habitat natural do vetor e sua adaptação a condições de vida antropogênicas. Consequentemente, a LV, antes considerada uma doença de áreas rurais e periurbanas, tornou-se uma grande preocupação para saúde pública, ao se estender para os centros urbanos (DINIZ et al., 2008 [Anexo 58]).

O homem é considerado um hospedeiro acidental, enquanto o cão doméstico é considerado o principal reservatório da LV em áreas urbanas. Contudo, há evidências de que outras espécies de animais domésticos e silvestres participam do ciclo da doença em áreas rurais e silvestres (ALEXANDER et al., 2002; BARNES et al., 1993; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; DIAS et al., 2003). A ocorrência de LV foi relatada em diferentes espécies de canídeos silvestres, tais como guaraxaim (*Cerdocyon thous*), lobo-guará (*Chysocyon brachyurus*), raposa do campo (*Lycalopex vetulus*) e cachorro do mato vinagre (*Spheotos venaticus*) (CURI, 2006; LUPPI et al., 2008 [Anexo 59]).

A expansão das áreas geográficas afetadas por LV é uma realidade marcante no Brasil (DINIZ et al., 2008 [Anexo 58]) e uma preocupação evidente na Europa (READY, 2010), principalmente devido ao desenvolvimento de condições favoráveis para o desenvolvimento do vetor, devido a alterações climáticas ou ambientais. Além disso, também tem aumentado os relatos da importância da transmissão da LV na

ausência do vetor flebotomíneo (PETERSEN, 2009). Nestes casos, exposição a insetos vetores alternativos, transmissão direta ou transmissão vertical, têm sido consideradas como possíveis rotas de infecção, embora o real mecanismo não esteja completamente claro (HARRIS, 1994; GASKIN et al., 2002; DANTAS-TORRES, 2011). Portanto, este capítulo discute uma forma alternativa de transmissão da LV recentemente descrita por nosso grupo (SANTOS et al., 2010 [Anexo 60]).

Considerando a influência genética sobre a susceptibilidade à leishmaniose (SAKTHIANANDESWAREN et al., 2009), embora não seja o foco deste Capítulo, citamos brevemente os trabalhos desenvolvidos por nosso grupo na área de imunidade inata contra LV em cães, que resultou em um protocolo eficiente para o isolamento de macrófagos caninos a partir de monócitos de sangue periférico (BUENO et al., 2005 [Anexo 56]). Esta linha também resultou na clonagem e sequenciamento do cDNA do gene *Nramp1* canino e no desenvolvimento de um protocolo experimental para análise fenotípica de resistência natural a LV em cães (BUENO et al., 2009 [Anexo 57]). Além disso, nosso grupo tem também atuado no diagnóstico e monitoramento de LV em populações de espécies selvagens mantidas em cativeiro na área urbana de Belo Horizonte (LUPPI et al., 2008 [Anexo 59]; MALTA et al., 2010 [Anexo 61]). Como resultado destes estudos, realizamos levantamento e caracterização de LV em canídeos selvagens, resultando em quatro positivos em uma população de 15 animais, com manifestação clínica clássica de LV em um cachorro do mato vinagre (*Spheotos venaticus*), espécie ameaçada de extinção (LUPPI et al., 2008 [Anexo 59]). Também foram estudados primatas não humanos, com a identificação de 12 animais positivos em uma população de 36 animais pertencentes a 11 espécies diferentes, inclusive com um

quadro clínico de LV em um guigó (*Callicebus nigrifrons*) (MALTA et al., 2010 [Anexo 61]).

4.2. Lesões genitais, placentárias e fetais e transmissão venérea da leishmaniose visceral canina

Os cães têm papel crucial na cadeia epidemiológica da LV, já que desenvolvem alto parasitismo cutâneo, conforme evidenciado em um dos nossos trabalhos em colaboração com o Dr. Wagner Tafuri (TAFURI et al., 2004 [Anexo 62]), atuando como abundante fonte de infecção para o flebotomíneo. A ocorrência frequente de cães assintomáticos é outro fator determinante para a persistência da doença (DINIZ et al., 2008 [Anexo 58]). As manifestações clínicas da LV canina podem variar desde uma infecção assintomática a uma doença sistêmica crônica, caracterizada por anemia, caquexia, febre, insuficiência renal crônica, lesões cutâneas, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia (OLIVEIRA et al., 1993; MARSELLA & GOPEGUI, 1998; MORENO & ALVAR, 2002). Contudo, cães com LV podem apresentar manifestações clínicas atípicas, associadas ou não a alterações sistêmicas, como lesões oculares e osteoarticulares (SOUZA et al., 2005 [Anexo 63]; CARVALHO NETA et al., 2007 [Anexo 64]), fazendo com que alguns casos possam oferecer dificuldade para o diagnóstico diferencial (NABITY et al., 2006 [Anexo 65]).

Indiscutivelmente, a principal via de infecção por *Leishmania* sp. é através de seu vetor biológico. Contudo, há relatos de transmissão da doença entre humanos por via vertical e parenteral, através de transfusão sanguínea, seringas ou acidente laboratorial (HARRIS, 1994). Em cães, foi descrita a transmissão do agente por

transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001) e por transfusão de hemácias (GIGER et al., 2002). Além disso, a ocorrência de casos autóctones de LV canina em áreas onde não há vetores biológicos, sugere a existência de vias alternativas de infecção que devem ser consideradas para o controle eficiente da doença (HARRIS, 1994; GASKIN et al., 2002). Foi descrita a prevalência de 41% de LV em um canil na região nordeste dos EUA localizado em área considerada livre de vetor flebotomíneo. A ocorrência de transmissão direta ou vertical de *Leishmania* entre cães, ou a atuação de um vetor invertebrado alternativo, foram sugeridas como possíveis fontes de infecção nesses casos (GASKIN et al., 2002).

No início dos anos 1960, foi relatado um caso de transmissão venérea de leishmaniose visceral em humanos (SYMMERS, 1960). Contudo, apenas recentemente demonstramos que esta pode ser uma via de infecção em cães (SILVA et al., 2009b [Anexo 66]). Estudos iniciais desenvolvidos pelo nosso grupo também descreveram o tropismo de *L. chagasi* para o trato genital masculino em cães, principalmente epidídimo, glândula e prepúcio, causando inflamação nestes órgãos (Figura 11) e eliminação do agente no sêmen (DINIZ et al., 2005 [Anexo 67]). A maioria dos cães naturalmente infectados elimina *Leishmania* no sêmen de forma intermitente, conforme demonstrado por reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção de DNA de kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* (do complexo donovani) em amostras de sêmen (SILVA et al., 2009b [Anexo 66]).

Lesões macroscópicas não são comuns no trato genital masculino de cães naturalmente infectados. Contudo, a frequência das alterações microscópicas no epidídimo, prepúcio e glândula é significativamente maior quando comparado a cães não infectados (DINIZ et al., 2005 [Anexo 67]), confirmando a predileção do parasita pelo

trato genital masculino de cães, o que se assemelha à descrição em humanos, com vários relatos de infecção do trato genital masculino (CAIN et al., 1994; KAPILA et al., 1994; SCHUBACH et al., 1998; CABELLO et al., 2002), enquanto há um único relato de lesão genital na mulher associado à transmissão venérea (SYMMERS, 1960).

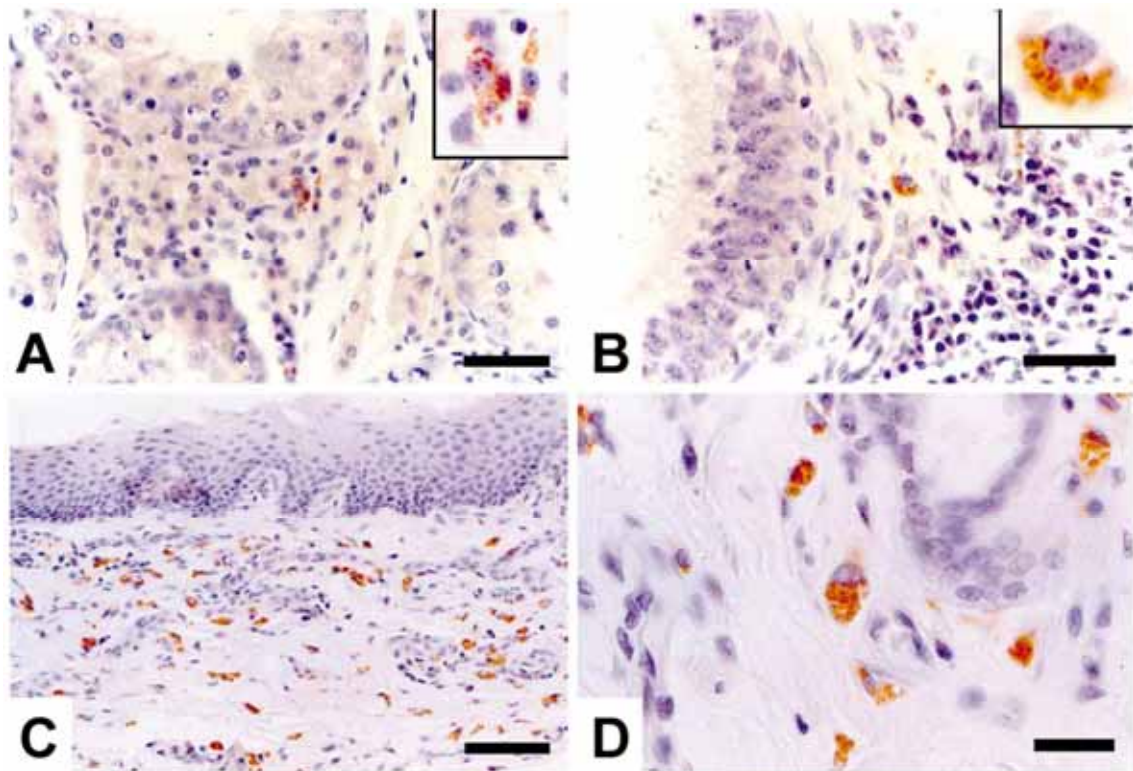


Figura 11. Imunomarcação de *Leishmania* sp. no trato genital de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*: (A) testículo, (B) epidídimo, (C) glândula e (D) prepúcio (Fonte: DINIZ et al., 2005 [Anexo 67]).

Amastigostas são comumente encontradas nos testículos de cães afetados, contudo, a frequência de orquite não é significativamente maior em cães com LV. Quando presentes, as formas amastigostas são frequentemente encontradas no citoplasma de macrófagos e associadas a infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário intersticial e degeneração testicular. No entanto, há aumento significativo da ocorrência de

epididimite em cães infectados, caracterizada por um infiltrado inflamatório linfoplasmo-histiocitário, que é mais acentuado em animais sintomáticos quando comparado a cães assintomáticos (DINIZ et al., 2005 [Anexo 67]). Já na glândula e prepúcio, o infiltrado é predominantemente histiocitário, com reação granulomatosa e alguns casos. Inúmeras amastigotas são observadas no interior de citoplasma de macrófagos (DINIZ et al., 2005 [Anexo 67]).

Cães naturalmente infectados por *L. chagasi* apresentam alteração na qualidade de sêmen, com diminuição da motilidade progressiva e aumento de defeitos espermáticos (ASSIS et al., 2009). As principais alterações espermáticas encontradas são o defeito de peça principal e desprendimento de cabeça (ASSIS et al., 2009), compatíveis com a localização das lesões no epidídimo (DINIZ et al., 2005 [Anexo 67]). ASSIS et al. (2009) ainda demonstraram que o tratamento de cães reprodutores acometidos pela LV com Alopurinol e Anfotericina B por 150 dias pode resultar em recuperação apenas parcial da qualidade espermática. Portanto, mesmo tratados, machos apresentam seu desempenho como reprodutores comprometido de maneira irreversível.

Ao contrário do observado em machos, em um de nossos estudos demonstramos recentemente que *L. chagasi* não apresenta tropismo pelo trato genital de cadelas (SILVA et al., 2008 [Anexo 68]). Tal fato sugere que a transmissão venérea seja unidirecional, ou seja, do macho infectado para a fêmea susceptível (SILVA et al., 2009b [Anexo 66]). No entanto, estudos adicionais são necessários para determinar se a transmissão venérea ocorre através do sêmen infectado ou da infecção da genitália externa do macho. A ocorrência de trauma, que é comum durante a cópula de cães pode favorecer a transmissão e, neste caso, a glândula e o prepúcio seriam a fonte provável de infecção (SILVA et al., 2009b [Anexo 66]). O estudo que descreveu a transmissão

venérea em cães baseou-se em parâmetros de infecção, como soroconversão e PCR positivo para kDNA de *Leishmania*, porém, não houve avaliação de desenvolvimento da doença clínica (SILVA et al, 2009b [Anexo 66]). Portanto, ainda não se sabe o real potencial de ocorrência de doença clínica em decorrência da infecção venérea, quando comparada à via de transmissão clássica pelo vetor flebotomíneo. Possivelmente, a inoculação de formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado pela picada do vetor seja mais eficiente do que a transmissão venérea de formas amastigotas. Isto se deve à presença de inúmeros fatores na saliva do vetor que favorecem a infecção (ALMEIDA et al., 2003; CAVALCANTE et al., 2003), tendo em vista a longa evolução adaptativa do parasita à resposta do hospedeiro no sítio da picada (PETERS & SACKS, 2009).

Embora cadelas não apresentem lesões genitais (SILVA et al., 2008 [Anexo 68]), estas são capazes de transmitir a infecção aos fetos por via congênita, como demonstrado por ROSYPAL et al. (2005) através de inoculação experimental de *Leishmania* em cadelas Beagle gestantes. Nesse estudo, os fetos foram removidos diretamente do útero, evitando a infecção fetal durante a passagem transvaginal, o que permitiu confirmar que a transmissão ocorreu por via transplacentária (ROSYPAL et al., 2005). Aborto em cadelas associado à placentite necrótica com presença de formas amastigotas de *Leishmania* na placenta acometida e não no feto abortado, já foi descrito (DUBEY, et al., 2005), além da infecção de neonatos (MASUCCI et al., 2003). Adicionalmente, a transmissão congênita de LV foi demonstrada em humanos (BOEHME et al., 2006; MEINECKE, et al., 1999) e em camundongos BALB/c experimentalmente infectados (ROSYPAL et al., 2005). Um estudo recente realizado por nosso grupo demonstrou elevada frequência de transmissão transplacentária de

Leishmania em cadelas gestantes naturalmente infectadas, tanto sintomáticas quanto assintomáticas. Tal fato indica que o quadro clínico do animal infectado não determina o potencial de transmissão vertical de LV (PANGRAZIO et al., 2009 [Anexo 69]). Além disso, o estudo sugere que a transmissão vertical ocorra primariamente através da placenta e considera que a via transvaginal possui um papel secundário na infecção fetal por *Leishmania*. Estes resultados são sustentados pelo estudo prévio que demonstrou a ausência de formas amastigotas na mucosa vaginal de cadelas naturalmente infectadas (SILVA et al., 2008 [Anexo 68]). A distribuição de formas amastigotas de *Leishmania* em tecidos fetais apresenta padrão semelhante ao descrito para cães adultos atingindo, principalmente, órgãos linfóides (baço, medula óssea e linfonodos) e fígado (PANGRAZIO et al., 2009 [Anexo 69]). No entanto, fetos infectados por *Leishmania* não apresentam as lesões clássicas de LV descritas em adultos, o que pode ser justificado pelo sistema imunológico que ainda se encontra em desenvolvimento durante a fase fetal.

4.3. Síntese da contribuição na área de leishmaniose

As transmissões vertical e venérea, na ausência do vetor biológico, são importantes vias de infecção de LV entre cães e devem ser consideradas ao estabelecer programas de erradicação da doença. Além disso, a utilização de cães infectados por *L. chagasi*, tratados ou não, é altamente desaconselhável para a reprodução, não só pela diminuição de sua qualidade espermática, como também pelo risco significativo de transmissão do agente através do sêmen. Por fim, as vias alternativas de transmissão descritas podem representar um impacto significativo em regiões com baixa prevalência

de LV e que teriam condições de alcançar o controle e a erradicação eficiente da doença.

Dada a importância das informações sobre estas vias alternativas de transmissão para o clínico que atua em áreas endêmicas para LV, publicamos um artigo nos Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia (SILVA et al., 2009c [Anexo 70]), distribuído para todos os veterinários dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

As publicações que deram suporte a este Capítulo estão listadas abaixo e suas separatas incluídas na seção de anexos.

BUENO, R., MELLO, M. N., MENEZES, C. A. S., DUTRA, W. O., **SANTOS, R. L.** Phenotypic, functional and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, p.521-524, 2005 (**Anexo 56**).

BUENO, R., CARVALHO NETA, A. V., XAVIER, M. N., OLIVEIRA, R. G., DINIZ, S. A., MELO, M. N., **SANTOS, R. L.** cDNA sequencing and expression of Nramp1 (Slc11a1) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.127, p.332-339, 2009 (**Anexo 57**).

DINIZ, S. A., SILVA, F. L., CARVALHO NETA, A. V., BUENO, R., GUERRA, R. M. S. N. C., ABREU-SILVA, A. L., **SANTOS, R. L.** Animal reservoir for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *Journal of Infection in Developing Countries*, v.2, p.24-33, 2008 (**Anexo 58**).

LUPPI, M. M., MALTA, M. C., SILVA, T. M. A., SILVA, F. L., MOTTA, R. O., MIRANDA, I., ECCO, R., **SANTOS, R. L.** Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.155, p.146-151, 2008 (**Anexo 59**).

SANTOS, R. L., COSTA, E. A., PANGRAZIO, K. K. Genital lesions and venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. In: Gregory V. LaMann. (Org.). *Veterinary Parasitology*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY. 2010, pp.193-200 (**Anexo 60**).

MALTA, M. C. C., TINOCO, H. P., XAVIER, M. N., VIEIRA, A. L. S., COSTA, E. A., **SANTOS, R. L.** Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.169, p.193-197, 2010 (**Anexo 61**).

TAFURI, W. L., **SANTOS, R. L.**, ARANTES, R. M., GONÇALVES, R., MELO, M. N., MICHALICK, M. S., TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, v.292, p.17-23, 2004 (**Anexo 62**).

SOUZA, A. I., JULIANO, R. S., GOMES, T. S., DINIZ, S. A., BORGES, A. M., TAFURI, W. L., **SANTOS, R. L.** Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology*, v.129, p.51-54, 2005 (**Anexo 63**).

CARVALHO NETA, A. V., PAIXÃO, T. A., SILVA, F. L., **SANTOS, R. L.** Panofthalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. *Clínica Veterinária*, v.12, n. 66, p.52-56, 2007 (**Anexo 64**).

NABITY, M. B., BARNHART, K., SNOWDEN, K. F., LOGAN, K. S., **SANTOS, R. L.**, KESSELL, A., MELMED, C. An atypical case of *Trypanosoma cruzi* infection in a young English Mastiff. *Veterinary Parasitology*, v.140, p.356-361, 2006 (**Anexo 65**).

SILVA, F. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M. A., XAVIER, M. N., NASCIMENTO, E.F., **SANTOS, R. L.** Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.160, n.1-2, p.55-59, 2009b (**Anexo 66**).

DINIZ, S. A., MELO, M. S., BORGES, A. M., BUENO, R., REIS, B. P., TAFURI, W. L., NASCIMENTO, E. F., **SANTOS, R. L.** Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology*, v.42, n.5, p.650-658, 2005 (**Anexo 67**).

SILVA, F. L., RODRIGUES, A. A., REGO, I. O., SANTOS, R. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M. A., XAVIER, M. N., NASCIMENTO, E. F., **SANTOS, R. L.** Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v.151, p.86-90, 2008 (**Anexo 68**).

PANGRAZIO, K. K., COSTA, E. A., AMARILLA, S. P., CINO, A. G., SILVA, T. M. A., PAIXÃO, T. A., COSTA, L. F., DENGUES, E. G., DIAZ, A. A. R., **SANTOS, R.**

L. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Veterinary Parasitology*, v. 165, p. 327-331, 2009 (**Anexo 69**).

SILVA, T. M. A., XAVIER, M. N., PANGRAZIO, K. K., COSTA, E. A., SANTOS, R.
L. Lesões genitais e transmissão venérea da leishmaniose visceral canina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 63, p. 27-35, 2009c (**Anexo 70**).

Neste trabalho foram abordadas as linhas de pesquisa mais importantes do nosso grupo de pesquisa, i.e. salmonelose, brucelose e leishmaniose. O doutoramento pleno no exterior, desenvolvido entre setembro de 1998 e outubro de 2001, na *Texas A&M University* (College Station, Texas EUA) e, subsequentemente, o curso de biologia molecular da célula, realizado no *Institut Pasteur* (Paris, França) de dezembro de 2004 a fevereiro de 2005, e, finalmente, o estágio sabático ou pós-doutorado realizado na *University of California at Davis* (Davis, Califórnia, EUA) entre 2006 e 2007, tiveram influência fundamental no direcionamento das nossas atividades de pesquisa. Ao iniciar o trabalho de pesquisa para o doutoramento no laboratório do Dr. Garry Adams, renomado pesquisador na área de brucelose, tópico que motivou a interação inicial com o referido laboratório, fomos surpreendidos com a disponibilidade de recursos e, portanto, de oportunidade para o trabalho com salmonelose. Então, apesar da predisposição ao trabalho com doenças reprodutivas, devido ao mestrado na área de reprodução animal, fizemos a opção pelo trabalho com *Salmonella*, que resultou em um trabalho de tese bastante produtivo para os padrões daquela instituição, apesar de concluído em tempo muito inferior a média. Ao retornar ao Brasil, nos deparamos com a questão da leishmaniose, doença que naquela época ainda era de introdução relativamente recente na região metropolitana de Belo Horizonte e que já se apresentava como um problema de relevância central nas áreas de saúde animal e saúde pública. O treinamento realizado no *Institut Pasteur* foi instrumental na implantação desta linha no nosso laboratório. Contudo, em nenhum momento abandonamos o plano original de trabalharmos com brucelose, uma doença zoonótica extremamente importante no Brasil.

Portanto, durante o estágio sabático, tivemos a oportunidade de trabalhar, na condição de *visiting associate professor*, concomitantemente em dois laboratórios, o laboratório do Dr. Andreas Baumler, dedicado primariamente ao trabalho com *Salmonella* e o laboratório da Dra. Renée Tsolis, uma das principais pesquisadoras em brucelose na atualidade. Portanto, foi possível, através desta trajetória, consolidar estas três linhas de pesquisa. A experiência internacional, que incluiu um grande programa de intercâmbio com a *Texas A&M University* e *University of Georgia*, ambas nos EUA, permitiu a mobilidade de vários alunos e professores, de forma que a realização de doutorado sanduíche, ou disciplinas de docentes americanos ministradas na UFMG tornaram-se rotina, o que permitiu aprimoramento constante do grupo como um todo. Esta intensa atividade de colaboração nos permitiu superar algumas dificuldades inerentes à realidade brasileira. Embora o Brasil esteja visivelmente passando por um momento de franco crescimento quantitativo e qualitativo no campo científico, ainda temos limitações que podem ser minimizadas pelo trabalho colaborativo, que também permite o caráter transdisciplinar dos projetos de pesquisa. Este esforço coletivo tem apresentado resultados satisfatórios em relação à qualidade de nossa produção científica, o que também expande o desafio de continuar produzindo com qualidade, captando recursos para dar sustentação a todo o processo e criar boas oportunidades de treinamento em pesquisa para os jovens.

Uma das estratégias mais que norteiam este trabalho é a vinculação de técnicas tradicionais em anatomia patológica, com métodos avançados, inclusive com manipulação genética de patógenos e aplicação de métodos de biologia molecular. Desta forma, temos tido oportunidade de oferecer oportunidade de treinamento com caráter eminentemente transdisciplinar. Outro benefício desta estratégia é que, o trabalho

predominante na investigação da patogênese, ou seja, pesquisa básica, resulta também na geração de métodos tecnológicos com grande potencial de aplicação em diagnóstico e prevenção das doenças em estudo.

Como evidenciado nas publicações anexadas a este documento, estas linhas de pesquisa têm nos proporcionado condições para formação de recursos humanos em vários níveis, da iniciação científica até o pós-doutoramento, além da oportunidade de colaboração com vários grupos nacionais e internacionais. Desta forma, durante os últimos anos foi possível consolidar um grupo de pesquisa competitivo, catalizando a capacidade deste mesmo grupo para captação de recursos para pesquisa.

Conforme salientado na introdução, a produção evidenciada neste texto corresponde a parte da produção total do autor. Portanto, para ilustração qualitativa da produção, são apresentadas abaixo, a evolução das citações dos trabalhos publicados pelo autor, segundo a base de dados *ISI Web of Science* (Figura 12). A produção do autor, indexada por estas bases de dados, conta atualmente (em 5 de fevereiro de 2011) com um total de 1.077 e 1.010 citações, segundo o *ISI Web of Science* e *Scopus*, respectivamente. Estas citações resultam atualmente em um fator h de 19 (HIRSCH, 2005).

Embora este documento evidencie a atuação do autor na área de pesquisa científica, é importante ressaltar o impacto que esta atividade tem tido nas atividades de ensino de graduação e de pós-graduação. A pesquisa dá ao docente excepcional visão crítica que influencia de forma marcante as atividades didáticas. Além disso, a área de patologia veterinária é de tal forma privilegiada que as atividades de extensão, no diagnóstico anátomo-patológico rotineiro, é uma fonte inesgotável de material para pesquisa. Tal aspecto pode ser ilustrado no presente trabalho pelo fato de que todas as

pesquisas abortadas no Capítulo 4 tiveram motivação inicial em um diagnóstico histopatológico de rotina realizado no Hospital Veterinário da UFMG. Portanto, desta forma tem havido absoluto entrelaçamento e indissociabilidade das atividades acadêmicas fins, i.e. do tripé ensino, pesquisa e extensão. Finalmente, no caso do autor deste trabalho, a atividade de pesquisa teve também influência decisiva nas atividades de administração acadêmica, certamente tendo tido papel crucial na condução do autor ao cargo de Pró-Reitor de Pesquisa da UFMG.

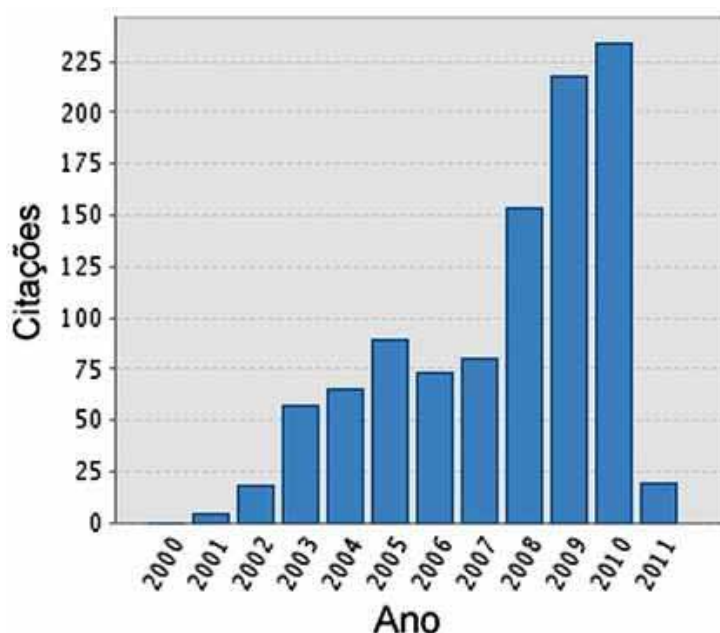


Figura 12. Número de citações do autor durante sua carreira científica. Os dados do ano de 2011 são parciais, tendo sido apurados no dia 05 de fevereiro de 2011. Fonte: *ISI Web of Science*.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. R., CHEVILLE, N. F., DEYOE, B. L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Veterinary Pathology*, v.25, p.28-35, 1988.
- ADAMS, L. G., TEMPLETON, J. W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev. Sci Tech.*, v. 17, p.200-219, 1998.
- ALEXANDER, B., CARVALHO, R. L., MCCALLUM, H., PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, p.1480-1485, 2002.
- ALMEIDA, M. C., VILHENA, V., BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.861-870, 2003.
- ALVES, G. E. S., HARTSFIELD, S. M., CARROLL, G. L., SANTOS, D. A. M. L., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G., SANTOS, R. L. Emprego do propofol, isoflurano e morfina para a anestesia geral de longa duração em bezerros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.4, p.411-420, 2003.
- ALTON, G. G., JONES, L. M., ANGUS, R. D., VERGER, J. M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as model zoonoses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.91, p.693-701, 1997.

- ASSIS, V. P., RIBEIRO, V. M., RACHID, M. A., CASTRO, A. C. S., VALLE, G. R.
Dogs with *Leishmania chagasi* infection have semen abnormalities that partially revert during 150 days of Allopurinol and Amphotericin B therapy. *Animal Reproduction Science*, 2009, in press.
- BARQUERO-CALVO, E., CHAVES-OLARTE, E., WEISS, D. S., GUZMÁN-VERRI, C., CHACON-DIAZ, C., RUCAVADO, A., MORIYON, I., MORENO, E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, v.7, e631, 2007.
- BARNES, J. C., STANLEY, O., CRAIG, T. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.202, p.416-418, 1993.
- BARTHEL, M., HAPFELMEIER, S., QUINTANILLA-MARTÍNEZ, L., KREMER, M., ROHDE, M., HOGARDT, M., PFEFFER, K., RÜSSMANN, H., HARDT, W. D. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and Immunity*, v.71, p.2839-2858, 2003.
- BERGSBAKEN, T., FINK, S. L., COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, v.7, p.99-109, 2009.
- BOEHME, C. C., HAIN, U., NOVOSEL, A., EICHENLAUB, S., FLEISCHMANN, E., LÖSCHER, T. Congenital visceral leishmaniasis. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, p.359-60, 2006.

- BRADLEY, D. J., TAYLOR, B. A., BLACKWELL, J., EVANS, E. P., FREEMAN, J.
Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clinical & Experimental Immunology*, v.37, p.7-14, 1979.
- BRENNAN, M. A., COOKSON, B. T. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular Microbiology*, v.38, p.31-40, 2000.
- BRENNER, F. W., VILLAR, R. G., ANGULO, F. J., TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.2466-2467, 2000.
- BRONZAN, R. N., TAYLOR, T. E., MWENECHANYA, J., TEMBO, M., KAYIRA, K., BWANAISA, L., NJOBVU, A., KONDOWE, W., CHALIRA, C., WALSH, A. L., PHIRI, A., WILSON, L. K., MOLYNEUX, M. E., GRAHAM, S. M. Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. *Journal of Infectious Diseases*, v.195, p.895-904, 2007.
- BUENO, R., CARVALHO NETA, A. V., XAVIER, M. N., OLIVEIRA, R. G., DINIZ, S. A., MELO, M. N., SANTOS, R. L. cDNA sequencing and expression of Nramp1 (Slc11a1) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.127, p.332-339, 2009.
- BUENO, R., MELLO, M. N., MENEZES, C. A. S., DUTRA, W. O., SANTOS, R. L.
Phenotypic, functional and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, p.521-524, 2005.

- CABELLO, I., CARABALLO, A., MILLAN, Y. Leishmaniasis in the genital area. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.44, p.105-107, 2002.
- CAIN, C., STONE, M. S., THIEBERG, M., WILSON, M. E. Nonhealing genital ulcers. *Archives of Dermatology*, v.130, p.1311-1316, 1994.
- CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *Journal of Infection*, v.45, p.122-127, 2002.
- CARVALHO JR., C. A. *Estudo andrológico, morfológico e ultrassonográfico em carneiros durante o curso de infecção experimental por Brucella ovis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010 (dissertação, mestrado em medicina veterinária).
- CARVALHO JR., C. A., XAVIER, M. N., COSTA, L. F., SILVEIRA, S. S., SANT'ANNA, F. M., BORGES, A. M., GOUVEIA, A. M. G., SANTOS, R. L. Causas infecciosas de infertilidade em machos da espécie ovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.34, p.160-167, 2010.
- CARVALHO NETA, A. V., MOL, J. P. S., XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, v. 184, p. 146-155, 2010.
- CARVALHO NETA, A. V., NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L. Brucelose suína. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.57-65, 2005.

- CARVALHO NETA, A. V., PAIXÃO, T. A., SILVA, F. L., SANTOS, R. L.
Panoftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. *Clínica Veterinária*, v.12, n. 66, p.52-56, 2007.
- CARVALHO NETA, A. V., STEYNEN, A. P. R., PAIXÃO, T. A., MIRANDA, K. L., SILVA, F. L., ROUX, C. M., TSOLIS, R. M., EVERTS, R. E., LEWIN, H. A., ADAMS, L. G., CARVALHO, A. F., LAGE, A. P., SANTOS R. L. Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, v.76, p. 1897-1907, 2008.
- CAVALCANTE, R. R., PEREIRA, M. H., GONTIJO, N. F. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, v.127, p.87-93, 2003.
- CECCHINATO, V., FRANCHINI, G. Th17 cells in pathogenic Simian Immunodeficiency Virus infection of macaques. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v.5, p.141-145, 2010.
- CELLI, J., CHASTELLIER, C., FRANCHINI, D. M., PIZZARRO-CERDA, J., MORENO, E., GORVEL, J. P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Medicine*, v.198, p.545-556, 2003.
- CHEN, L. M., KANIGA, K., GALÁN, J. E. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular Microbiology*, v.21, p.1101-1115, 1996.
- COSTA, E. A., BOMFIM, M. R. Q., FONSECA, F. G., DRUMOND, B. P., COELHO, F. M., VASCONCELOS, A. C., FURTINI, R., PAIXÃO, T. A., TSOLIS, R. M.,

- SANTOS, R. L., RESENDE, M. Ovine Herpesvirus 2 Infection in Foal, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, p.844-845, 2009.
- COSTA, L. F. *Avaliação comparativa entre PCR espécie-específica, PCR gênero-específica e nested PCR espécie-específica no diagnóstico da infecção por Brucella ovis*. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, 2010 (dissertação, mestrado).
- CURI, N. H. A., MIRANDA, I., TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.1-5, 2006.
- D'ANASTASIO, R., ZIPFEL, B., MOGGI-CECCHI, J., STANYON, R., CAPASSO, L. Possible brucellosis in an early hominin skeleton from sterckfontein, South Africa. *PLoS One*, v.30, e6439, 2009.
- DANDEKAR, S., GEORGE, M. D., BAUMLER, A. J. Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v.5, p.173-178, 2010.
- DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.48, p.151-156, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*, 2011, No prelo.
- DARWIN, K. H., MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology*, v.12, p.405-428, 1999.

- DE JONG, M. F., ROLÁN, H. G., TSOLIS, R. M. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. *Cellular Microbiology*, v.12, p.1195-1202, 2010.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinical Dermatology*, v.14, p.417-423, 1996.
- DEVINNEY, R., STEELE-MORTIMER, O., FINLAY, B. B. Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trends in Microbiology*, v.8, p.29-33, 2000.
- DIAS, F. O., LOROSA, E. S., REBELO, J. M. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública*, v.19, p.1373-1380, 2003.
- DINIZ, S. A., MELO, M. S., BORGES, A. M., BUENO, R., REIS, B. P., TAFURI, W. L., NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology*, v.42, n.5, p.650-658, 2005.
- DINIZ, S. A., SILVA, F. L., CARVALHO NETA, A. V., BUENO, R., GUERRA, R. M. S. N. C., ABREU-SILVA, A. L., SANTOS, R. L. Animal reservoir for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *Journal of Infection in Developing Countries*, v.2, p.24-33, 2008.
- DUBEY, J. P., ROSYPAL, A. C., PIERCE, V., SCHEINBERG, S. N., LINDSAY, D. S. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.227, p.1266-1269, 2005.

- FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity - a personal recollection 15 years later. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p.67-72, 2004.
- FINK, S. L., COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular Microbiology*, v.8, p.1812-1825, 2006.
- FOSTER, G., OSTERMAN, B. S., GODFROID, J., JACQUES, I., CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. Nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p.2688-2693, 2007.
- FOULONGNE, V., BOURG, G., CAZEVIEILLE, C., MICHAUX-CHARACHON, S., O'CALLAGHAN, D. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signaturetagged transposon mutagenesis. *Infection and Immunity*, v.68, p.1297-1303, 2000.
- FRANCHI, L., AMER, A., BODY-MALAPEL, M., KANNEGANTI, T. D., OZÖREN, N., JAGIRDAR, R., INOHARA, N., VANDENABEELE, P., BERTIN, J., COYLE, A., GRANT, E. P., NÚÑEZ, G. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *Salmonella*-infected macrophages. *Nature Immunology*, v.7, p.576-582, 2006.
- GALÁN, J. E., ZHOU, D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.97, p.8754-8761, 2000.

- GALBRAITH, N. S. Studies of human salmonellosis in relation to infection in animals. *Veterinary Record*, v.73, p.1296-1303, 1961.
- GARRITY, G. M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ed. New York: Springer, 2001. 721 pp.
- GASKIN, A. A., SCHANTZ, P., JACKSON, J., BIRKENHEUER, A., TOMLINSON, L., GRAMICCIA, M., LEVY, M., STEURER, F., KOLLMAR, E., HEGARTY, B. C., AHN, A., BREITSCHWERDT, E. B. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.16, p.34-44, 2002.
- GIGER, U., OAKLEY, D. A., OWENS, S. D., SCHANTZ, P. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*, v.42, p.381-383, 2002.
- GODINEZ, I., HANEDA, T., RAFFATELLU, M., PAIXÃO, T. A., ROLÁN, H. G., SANTOS, R. L., GEORGE, M. D., DANDEKAR, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infection and Immunity*, v.76, p. 2008-2017, 2008.
- GODINEZ, I., RAFFATELLU, M., CHU, H., PAIXÃO, T. A., HANEDA, T., SANTOS, R. L., BEVINS, C. L., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J. IL-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infection and Immunity*, v.77, p.387-398, 2009.
- GORDON, M. A. , BANDA, H. T., GONDWE, M., GORDON, S. B., BOEREE, M. J., WALSH, A. L., CORKILL, J. E., HART, C. A., GILKS, C. F., MOLYNEUX, M. E.

Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia among HIV-infected Malawian adults: high mortality and frequent recrudescence. *AIDS*, v.16, p.1633-1641, 2002.

GRAHAM, S. M., MOLYNEUX, E. M., WALSH, A. L., CHEESBROUGH, J. S., MOLYNEUX, M. E., HART, C. A. Nontyphoidal *Salmonella* infections of children in tropical Africa. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 19:1189–1196, 2000.

GRIMALIDI JR., G., TESH, R. B., MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.41, p.687-725, 1989.

GROS P., SKAMENE, E. FORGET, A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *Journal of Immunology*, v.127, p.2417-2421, 1981.

GRUENHEID, S., PINNER, E., DESJARDINS, M., GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *Journal of Experimental Medicine*, v.185, p.717-730, 1997.

HARRIS, M. P. Suspected transmission of leishmaniasis. *Veterinary Record*, v.135, p.339, 1994.

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

HASHIMOTO, Y., EZAKI, T., LI, N., YAMAMOTO, H. Molecular cloning of the ViaB region of *Salmonella typhi*. *FEMS Microbiology Letters*, v.69, p.53-56, 1991.

- HIRSCH, J. E. An index to quantify an individual's scientific research output. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.102, p.16569-16572, 2005.
- HONG, P. C., TSOLIS, R. M., FICHT, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infection and Immunity*, v.68, p.4102-4107, 2000.
- KAPILA, K., PRAKASH, M. B., MEHROTA, R., VERMAR, K. Testicular leishmaniasis in a boy with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Cytologica*, v.38, p.878-879, 1994.
- KHARE, S., FICHT, T. A., SANTOS, R. L., ROMANO, J., FICHT, A. R., ZHANG, S., GRANT, I. R., LIBAL, M., HUNTER, D., ADAMS, L. G. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.3, p.1075-1081, 2004.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, v.4, p.1-24, 1990.
- KINGSLEY, R. A., SANTOS, R. L., KEESTRA, A. M., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding-protein that is expressed in the intestine. *Molecular Microbiology*, v.43, n.4, p.895-905, 2002.

- KOLYVA, S., WAXIN, H., POPOFF, M. Y. The Vi antigen of *Salmonella typhi*: molecular analysis of the *viaB* locus. *Journal of General Microbiology*, v.138, p.297-304, 1992.
- KUBORI, T., MATSUSHIMA, Y., NAKAMIRA, D., URALIL, J., LARA-TEJERO, M., SUKHAN, A., GALÁN, J. E., AIZAWA, S. I. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, v.280, p.602-605, 1998.
- LIANG, P., PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, v.257, p.967-971, 1992.
- LINDGREN, S. W., STOJILJKOVIC, I., HEFFRON, F. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.93, p.4197-4201, 1996.
- LISSNER, C. R., SWANSON, R. N., O'BRIEN, A. D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *Journal of Immunology*, v.131, p.3006-3013, 1983.
- LIU, J. Z., PEZESHKI, M., RAFFATELLU, M. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine*, v.48, p.156-160, 2009.
- LUNDBERG, U., VINATZER, U., BERDNIK, D., VON GABAIN, A., BACCARINI, M. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis

correlates with transient expression of SPI-1 genes. *Journal of Bacteriology*, v.181, p.3433-3437, 1999.

LUPPI, M. M., MALTA, M. C., SILVA, T. M. A., SILVA, F. L., MOTTA, R. O., MIRANDA, I., ECCO, R., SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.155, p.146-151, 2008.

MALTA, M. C. C., TINOCO, H. P., XAVIER, M. N., VIEIRA, A. L. S., COSTA, E. A., SANTOS, R. L. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.169, p.193-197, 2010.

MANTEROLA, L., TEJERO-GARCES, A., FICAPAL, A., SHOPAYEVA G., BLASCO J. M., MARÍN, C. M., LÓPEZ-GOÑI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Veterinary Microbiology*, v.92, p.65-72, 2003.

MARSELLA, R., GOPEGUI, R. R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *International Journal of Dermatology*, v.37, p.801-814, 1998.

MARTINS, T. M., PAIXÃO, T.A., COSTA, E. A., PIRES, A.C., SANTOS, R. L., BORGES, Á. M. Postpartum expression of Toll-like receptors and β -defensin 5 in the endometrium of Holstein cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.139, p.277-281, 2011.

MASUCCI, M., DE MAJO, M., CONTARINO, R. B., BORRUTO, G., VITALE, F., PENNISI, M. G. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*, v.27, suppl.1, p.771-774, 2003.

- MATTAPALLIL, J. J., DOUEK, D. C., HILL, B., NISHIMURA, Y., MARTIN, M., ROEDERER, M. Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, v.434, p.1093-1097, 2005.
- MAUEL, J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *Journal of Leukocyte Biology*, v.47, p.187-193, 1990.
- MAURICIO, I. L., HOWARD, M. K., STOTHARD, J. L., MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v.119, p.237-246, 1999.
- MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, p.607-625, 1999.
- MEADOR, V. P., DEYOE, B. L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Veterinary Pathology*, v.26, p.513-515, 1989.
- MEINECKE, C. K., SCHOTTELIUS, J., OSKAM, L., FLEISCHER, B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*, v.104, e.65, 1999.
- MIAO, E. A., ALPUCHE-ARANDA, C. M., DORS, M., CLARK, A. E., BADER, M. W., MILLER, S. I., ADEREM, A. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature Immunology*, v.7, p.569-575, 2006.
- MIAO, E. A., LEAF, I. A., TREUTING, P. M., MAO, D. P., DORS, M., SARKAR, A., WARREN, S. E., WEWERS, M. D., ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptosis is

- an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nature Immunology*, v.11, p.1136-1142, 2010.
- MIRANDA, K. L., COTTORELO, A. C. P., POESTER, F. P., LAGE, A. P. Brucelose canina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.66-82, 2005.
- MONACK, D. M., RAUPACH, B., HROMOCKYJ, A. E., FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.93, p.9833-9838, 1996.
- MORENO, J., ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, v.18, p.399-405, 2002.
- NABITY, M. B., BARNHART, K., SNOWDEN, K. F., LOGAN, K. S., SANTOS, R. L., KESSELL, A., MELMED, C. An atypical case of *Trypanosoma cruzi* infection in a young English Mastiff. *Veterinary Parasitology*, v.140, p.356-361, 2006.
- NARDI, R. M., SILVA, M. E., VIEIRA, E. C., BAMBIRRA, E. A., NICOLI, J. R. Intragastric infection of germfree and conventional mice with *Salmonella typhimurium*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.22, p.1389-1392, 1989.
- NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L. *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 137p.
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.5-9, 2002.

- O'CALLAGHAN, D., CAZEVIEILLE, C., ALLARDET-SERVENT, A., BOSCHIROLI, M. L., BOURG, G., FOULONGNE, V., FRUTOS, P., KULAKOV, Y., RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology*, v.33, p.1210-1220, 1999.
- OLIVEIRA, G. G., SANTORO, F., SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.88, p.243-248, 1993.
- OWENS, S. D., OAKLEY, D. A., MARRYOTT, K., HATCHETT, W., WALTON, R., NOLAN, T. J., NEWTON, A., STEURER, F., SCHANTZ, P., GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.219, p.1076-1083, 2001.
- PAIXÃO, T. A., CARVALHO NETA, A. V., SANTOS, R. L., PAIVA, N. O., REIS, J. R., BARBOSA, M. S., SERRA, C. V., SILVA, R. R., BECKHAM, T. R., MARTIN, B. M., CLARKE, N. P., ADAMS, L. G. Diagnosis of Foot-and Mouth Disease by real time RT-PCR under field conditions in Brazil. *BMC Veterinary Research*, v.4, n.53, 2008.
- PAIXÃO, T. A., COSTA, E. A., XAVIER, M. N., SILVA, T. M. A., SANTOS, R. L. Innate immunity in brucellosis. In: *Research Advances in Infection & Immunity*. Kerala (Índia): Global Research Network, v.1, 2009a, pp. 21-37.

- PAIXÃO, T. A., FERREIRA, C., BORGES, A. M., OLIVEIRA, D. A. A., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.109, p.37–42, 2006.
- PAIXÃO, T. A., POESTER, F. P., CARVALHO NETA, A. V., BORGES, A. M., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. *NRAMP1* 3'UTR polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infection and Immunity*. v.75, p. 2493-2499, 2007.
- PAIXÃO, T. A., RÊGO, I. O. P., SANTOS, R. L. Anti-*Sarcocystis neurona* immunostaining associated with equine protozoal myeloencephalitis (EPM) in Brazil. *Ciência Rural*, v.37, n.6, p.1820-1823, 2007.
- PAIXÃO, T. A., ROUX, C. M., DEN HARTIGH, A. B., SANKARAN-WALTERS, S., DANDEKAR, S., SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, v. 77, p. 4197-4208, 2009b.
- PANGRAZIO, K. K., COSTA, E. A., AMARILLA, S. P., CINO, A. G., SILVA, T. M. A., PAIXÃO, T. A., COSTA, L. F., DENGUES, E. G., DIAZ, A. A. R., SANTOS, R. L. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Veterinary Parasitology*, v. 165, p. 327-331, 2009.

- PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P., AKRITIDIS, N., CHRISTOU, L., TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*, v.6, p.91-99, 2006.
- PETERS, N. C., SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology*, v.11, p.1290-1296, 2009.
- PETERSEN, C. A. Leishmaniasis, an Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States. *Topics in Companion Animal Medicine*, v.24, p.182-188, 2009.
- POESTER, F. P., GONÇALVES, V. S., LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.55-62, 2002.
- POESTER, F.P., GONÇALVES, V. S. P., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L., OLSEN, S. O., SCHURIG, G. G., LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, n.25, p.5327-5334, 2006.
- POESTER, F. P., NIELSEN, K., SAMARTINO, L. E., YU, W. L. Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Sciences Journal*, v.4, p. 46-60, 2010.
- PRICE, R. E., TEMPLETON, J. W., SMITH III, R., ADAMS, L. G. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, v.58, p.879-886, 1990.
- QURESHI, T., TEMPLETON, J. W., ADAMS, L. G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella* Dublin, and *Salmonella*

typhimurium in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*.
Veterinary Immunology and Immunopathology, v.50, p.55-65, 1996.

RAFFATELLU, M., GEORGE, M. D., AKIYAMA, Y., HORNSBY, M. J., NUCCIO, S. P., PAIXÃO, T. A., CHU, H., SANTOS, R. L., BERGER, T., MAK, T. W., TSOLIS, R. M., BEVINS, C. L., SOLNICK, J., DANDEKAR, S., BÄUMLER, A. J. Lipocalin-2 resistance of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium is an adaptation to life in the inflamed intestine. *Cell Host & Microbe*, v.5, p.476-486, 2009.

RAFFATELLU, M., SANTOS, R. L., CHESSA, D., WILSON, R. P., WINTER, S. E., ROSSETTI, C. A., LAWHON, S. D., CHU, H., LAU, T., BEVINS, C. L., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. The presence of the *viaB* locus reduces IL-17 and CXCL chemokine expression in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infection and Immunity*, v.75, p.4342-4350, 2007.

RAFFATELLU, M., SANTOS, R. L., VERHOEVEN, D., WILSON, R. P., WINTER, S. E., GODINEZ, I., SANKARAN, S., PAIXÃO, T. A., GEORGE, M. D., GORDON, M. A., KOLLS, J., DANDEKAR, S., BÄUMLER, A. J. IL-17 orchestrates a mucosal response against *Salmonella* dissemination from the gut. *Nature Medicine*, v.14, p.421-428, 2008.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveillance*, v.15, pii=19505, 2010.

REIS, B. P., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G., SANTOS, R. L. The attenuated *sopB* mutant of *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium has the same tissue distribution and host chemokine response as the wild type in bovine Peyer's patches. *Veterinary Microbiology*, v.97, p.269-277, 2003.

REIS JR., J. L., KANAMURA, C. T., MACHADO, G. M., FRANÇA, R. O., BORGES, J. R. J., SANTOS, R. L. Orbital (retrobulbar) meningioma in a Simmental cow. *Veterinary Pathology*, v.44, n.4, p.504-507, 2007.

ROLÁN, H. G., XAVIER, M. N., SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M. Natural antibody contributes to host defense against an attenuated *Brucella abortus virB* mutant. *Infection and Immunity*, v.77, n.7, p.3004-3013, 2009.

ROSYPAL, A. C., TROY, G. C., ZAJAC, A. M., FRANK, G., LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*, v.91, p.970-972, 2005.

ROUX, C. M., BUTLER, B. P., CHAU, J. Y., PAIXÃO, T. A., CHEUNG, K. W., SANTOS, R. L., LUCKHART, S., TSOLIS, R. M. Both hemolytic anemia and malaria parasite-specific factors increase susceptibility to non-typhoidal *Salmonella* infection in mice. *Infection and Immunity*, v.78, p.1520-1527, 2010.

ROUX, C. M., ROLÁN, H. G., SANTOS R. L., BEREMAND, P. D., THOMAS, T. L., ADAMS, L. G., TSOLIS, R. M. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cellular Microbiology*, v.9, p.1851-1869, 2007.

SAKTHIANANDESWAREN, A., FOOTE, S. J., HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v.25, p.383-391, 2009.

- SALCEDO, S. P., MARCHESINI, M. I., LELOUARD, H., FUGIER, E., JOLLY, G., BALOR, S., MULLER, A., LAPAQUE, N., DEMARIA, O., ALEXOPOULOU, L., COMERCI, D. L., UGALDE, R. A., PIERRE, P., GORVEL, J. P. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein BTP1. *Plos Pathogens*, v.4, p.1-16, 2008.
- SAMARTINO, L. E., ENRIGHT, F. M. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *American Journal of Veterinary Research*, 53:359-363, 1992.
- SANTOS, R. L. Aborto em bovinos: causas e diagnóstico diferencial. *Leite Integral*, ano 3, n.19, p.40-45, 2009.
- SANTOS, R. L., ADAMS, L. G. Bactérias ‘aproveitadoras’. Funções das próprias células infectadas são usadas para favorecer doenças. *Ciência Hoje*. v.29, n. 172, p. 64-66, 2001.
- SANTOS, R. L., ALMEIDA, A. P., XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., WILSON, R. P., DANDEKAR, S., RAFFATELLU, M., BÄUMLER, A. J. Enteric pathology and *Salmonella*-induced cell death in healthy and SIV-infected rhesus macaques. *Veterinary Pathology*, 2011. No prelo.
- SANTOS, R. L., BÄUMLER, A. J. Cell tropism of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, v.294, n.4, p.225-233, 2004.
- SANTOS, R. L., BEVINS, C. L., ADAMS, L. G., RAFFATELLU, M., TÜKEL, Ç., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in Microbiology*, v. 17, p. 498-506, 2009.

- SANTOS, R. L., COSTA, E. A., PANGRAZIO, K. K. Genital lesions and venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. In: Gregory V. LaMann. (Org.). *Veterinary Parasitology*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2010, pp.193-200.
- SANTOS, R. L., PAIXÃO, T. A., BÄUMLER, A. J. Revelado mecanismo que facilita invasão de bactérias em pacientes de AIDS. *Ciência Hoje*, v. 43, p.69-71, 2008b.
- SANTOS, R. L., POESTER, F. P., LAGE, A. P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.42-56, 2005b.
- SANTOS, R. L., SCHOFFELMEER, J. A., TSOLIS, R. M., GUTIÉRREZ-PABELLO, J. A. G., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. *Salmonella typhimurium* infection of bovine Peyer's patches downregulates plasma membrane calcium transporting ATPase expression. *Journal of Infectious Disease*, v.186, n.3, p.372-378, 2002a.
- SANTOS, R. L., SILVA, F. L., PAIXÃO, T. A., SAMARTINO, L. E. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.83-98, 2005a.
- SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. Hematologic and serum biochemical changes in *Salmonella* ser Typhimurium-infected calves. *American Journal of Veterinary Research*, V.63, n.8, p.1145-1150, 2002c.
- SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis: a review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Sciences*, v.36, n.1, p.3-12, 2003.

- SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BAUMLER, A. J., SMITH III, R., ADAMS, L. G. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by an early *sipB*-dependent and a delayed *sipB*-independent mechanism. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 4, p. 2293-2301, 2001b.
- SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., ZHANG, S., FICHT, T. A., BAUMLER, A. J., ADAMS, L. G. *Salmonella*-induced cell death is not required for enteritis in calves. *Infection and Immunity*, v.69, n.7, p. 4610-4617, 2001c.
- SANTOS, R. L., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Veterinary Pathology*, v.39, n.2, p. 200-215, 2002b
- SANTOS, R. L., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., KINGSLEY, R. A., ADAMS, L. G. BAUMLER, A. J. Animal models of *Salmonella* infections: gastroenteritis vs. typhoid fever. *Microbes & Infection*, v.3, n.14-15, p.1335-1344, 2001a.
- SANTOS, V. L. S. L., WILLIAMS, S. M., BARBOSA, T., ZAVALA, G., ZHANG, J., CHENG, S., SHIVAPRASAD, H. L., HAFNER, S., FADLY, A., SANTOS, R. L., BROWN, C. C. Detection of reticuloendotheliosis virus by immunohistochemistry and in situ hybridization in experimentally infected Japanese quail embryos and archived formalin-fixed and paraffin embedded tumors. *Avian Pathology*, v. 37, p. 451-456, 2008a.
- SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E., WHATMORE, A. M., QUANCE, C. R., KOYLASS, M. S., CUMMINS, L. B., DICK, E. J., SNIDER, C. L., CAPPELLI, D., EBERSOLE, J. L., NATHANIELSZ, P. W., HUBBARD, G. B. A novel *Brucella*

isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *Journal of Medical Primatology*, v.38, p.70-73, 2009.

SCHOLZ, H. C., HUBALEK, Z., SEDLÁČEK, I., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., MELZER, F., KÄMPFER, P., NEUBAUER, H., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M. S., WHATMORE, A. M., FALSÉN, E., BAHN, P., GÖLLNER, C., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J., NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.58, p.375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C., NÖCKLER, K., GÖLLNER, C., BAHN, P., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., KÄMPFER, P., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M. S., WHATMORE, A. M., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J., DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p.801-808, 2010.

SCHUBACH, A., CUZZI-MAYA, T., GONÇALVES-COSTA, S. C., PIRMEZ, C., OLIVEIRA-NETO, M. P. Leishmaniasis of glans penis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v.10, p.226-228, 1998.

SHARMA, A., QADRI, A. Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.101, p.17492-17497, 2004.

- SHARMA, U., SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, v.45, p.255-272, 2008.
- SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.89, p.471-478, 1994.
- SIEIRA, R., COMERCI, D. J., SANCHEZ, D. O., UGALDE, R. A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of Bacteriology*, v.182, p.4849-4855, 2000.
- SILVA, A. P. C., RODRIGUES, S. C. O., MERLO, F. A., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L. Acute and chronic histopathologic changes in wild type or TLR-2^{-/-}, TLR-4^{-/-}, TLR-6^{-/-}, TLR-9^{-/-}, CD14^{-/-}, and MyD-88^{-/-} mice experimentally infected with *Plasmodium chabaudi*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2011. No prelo.
- SILVA, F. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M. A., XAVIER, M. N., NASCIMENTO, E.F., SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.160, n.1-2, p.55-59, 2009b.
- SILVA, F. L., PAIXÃO, T. A., BORGES, A. M., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Brucelose bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.1-12, 2005.
- SILVA, F. L., RODRIGUES, A. A., REGO, I. O., SANTOS, R. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M. A., XAVIER, M. N., NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v.151, p.86-90, 2008.

- SILVA, T. M. A., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., TSOLIS, R. M., SANTOS, R. L. Laboratory animal models for brucellosis research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. No prelo.
- SILVA, T. M. A. *Identificação de genes envolvidos na patogênese de Brucella ovis em modelo murino*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010 (dissertação, mestrado em medicina veterinária).
- SILVA, T. M. A., OLIVEIRA, R. G., MOL, J. P. S., XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., CORTEZ, A., HEINEMANN, M. B., RICHTZENHAIN, L. J., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Ciência Rural*, v. 39, p. 2563-2570, 2009a.
- SILVA, T. M. A., PAIXÃO, T. A., COSTA, E. A., XAVIER, M. N., SÁ, J. C., MOUSTACAS, V. S., DEN HARTIGH, A. B., CARVALHO NETA, A. V., OLIVEIRA, S. C., TSOLIS, R. M., SANTOS, R. L. Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infection and Immunity*, 2011. No prelo.
- SILVA, T. M. A., XAVIER, M. N., PANGRAZIO, K. K., COSTA, E. A., SANTOS, R. L. Lesões genitais e transmissão venérea da leishmaniose visceral canina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 63, p. 27-35, 2009c.
- SOUZA, A. I., JULIANO, R. S., GOMES, T. S., DINIZ, S. A., BORGES, A. M., TAFURI, W. L., SANTOS, R. L. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology*, v.129, p.51-54, 2005.

- STEVENS, M. P., HUMPHREY, T. J., MASKELL, D. J. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v.364, p.2709-2723, 2009.
- SUN, Y. H., DEN HARTIGH A. B., SANTOS, R. L., ADAMS, L. G., TSOLIS, R. M. *virB*-mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or macrophage NADPH oxidase in macrophages. *Infection and Immunity*, v.70, n.9, p.4826-4832, 2002.
- SYMMERS, W.S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet*, v.16, p.127-132, 1960.
- TAFURI, W. L., SANTOS, R. L., ARANTES, R. M., GONÇALVES, R., MELO, M. N., MICHALICK, M. S., TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, v.292, p.17-23, 2004.
- TILLER, R. V., GEE, J. E., LONSWAY, D. R., GRIBBLE, S., BELL, S. C., JENNISON, A. V., BATES, J., COULTER, C., HOFFMASTER, A. R., DE, B. K. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*, v.10, p.23, 2010.
- TRUJILLO, I. Z., ZAVALA, A. N., CACERES, J. G., MIRANDA, C. Q. Brucellosis infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.8, p.225-241, 1994.

TSOLIS, R. M., ADAMS, L. G., FICHT, T. A., BÄUMLER, A. J. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infection and Immunity*, v.67, p.4879-4885, 1999b.

TSOLIS, R. M. Comparative genome analysis of the α -proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.99, p.12503-12505, 2002.

TSOLIS, R. M., KINGSLEY, R. A., TOWNSEND, S. M., FICHT, T. A., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. Of mice, calves, and men. Comparison of the mouse typhoid model with other *Salmonella* infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.473, p.261-274, 1999a.

TSOLIS, R. M., SESHADRI, R., SANTOS, R. L., SANGARI, F. J., GARCÍA LOBO, J. M., REN, Q., MYERS, G., BRINKAC, L., NELSON, W., DEBOY, R., ANGIUOLI, S., KHOURI, H., DIMITROV, G., ROBINSON, J., MULLIGAN, S., DE JONG, M. F., WALKER, R. L., ELZER, P. E., HALLING, S. L., HASSAN, K. A., PAULSEN, I. T. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *Plos ONE*, v.4, n.5, e5519, 2009.

TSOLIS, R. M., XAVIER, M. N., SANTOS, R. L., BAUMLER, A. J. How to become a top model: The impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infection and Immunity*, 2011. No prelo.

VAN DER VELDEN, A. W. M., LINDGREN, S. W., WORLEY, M. J., HEFFRON, F. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected

- macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infection and Immunity*, v.68, p.5702-5709, 2000.
- VAN DER VELDEN, A. W. M., VELASQUEZ, M., STARNBACH, M. N. *Salmonella* rapidly kill dendritic cells via a caspase-1-dependent mechanism. *Journal of Immunology*, v.171, p.6742-6749, 2003.
- VIDAL, S., GROS, P., SKAMENE, E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies *Nramp1* as *Bcg/Ity/Lsh* locus. *Journal of Leukocyte Biology*, v.58, p.382-390, 1995.
- WATSON, K. G., HOLDEN, D. W. Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella in vivo*. *Cellular Microbiology*, v.12, p.1389-1397, 2010.
- WINTER, S. E., WINTER, M. G., GODINEZ, I., YANG, H. J., RÜSSMANN, H., ANDREWS-POLYMENIS, H. L., BÄUMLER, A. J. A rapid change in virulence gene expression during the transition from the intestinal lumen into tissue promotes systemic dissemination of *Salmonella*. *PLoS Pathogens*, v.6, e1001060, 2010.
- XAVIER, M. N., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural*, v. 39, p. 2252-2260, 2009a.
- XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., DEN HARTIGH, A. B., TSOLIS, R. M., SANTOS, R. L. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Sciences Journal*, v. 4, p. 109-118, 2010a.
- XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., POESTER, F. P., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Pathology, immunohistochemistry, and bacteriology of tissues and milk of cows and

fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *Journal of Comparative Pathology*, v.140, n.3-4, p.147-157, 2009b.

XAVIER, M. N., SILVA, T. M. A., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., MOUSTACAS, V. S., CARVALHO JÚNIOR, C. A., SANT'ANNA, F. M., ROBLES, C. A., GOUVEIA, A. M. G., LAGE, A. P., TSOLIS, R. M., SANTOS, R. L. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary Microbiology*, v. 145, p. 158-164, 2010b.

ZHANG, S., KINGSLEY, R. A., SANTOS, R. L., ANDREWS-POLYMENIS, H., RAFFATELLU, M., FIGUEIREDO, J., NUNES, J., TSOLIS, R. M., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and Immunity*, v.71, n.1, p.1-12, 2003.

ZHANG, S., SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., MIROLD, S., HARDT W. D., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J. Phage mediated horizontal transfer of the *sopE1* gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. *FEMS Microbiology Letters*, V.217, n.2, p.243-247, 2002a.

ZHANG, S., SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., STENDER, S., HARDT, W. D., BÄUMLER, A. J., ADAMS, L. G. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and Immunity*, v.70, n.7, p.3843-3855, 2002b.

ANEXOS

Nos anexos estão separatas de 70 trabalhos, publicados ou aceitos para publicação, que foram utilizados na elaboração dos capítulos deste documento.