

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

Társila Ferreira Guimarães Goyatá

**“Avaliação dos mecanismos imunológicos associados ao aumento da
resistência de animais tratados com Talidomida frente à infecção com
Brucella abortus”**

Juiz de Fora – MG
2014

TÁRSILA FERREIRA GUIMARÃES GOYATÁ

“Avaliação dos mecanismos imunológicos associados ao aumento da resistência de animais tratados com Talidomida frente à infecção com *Brucella abortus*”

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

Orientador: Prof. Doutor Gilson C. Macedo.

Juiz de Fora
2014

Társila Ferreira Guimarães Goyatá

“Avaliação dos mecanismos imunológicos associados ao aumento da resistência de animais tratados com Talidomida frente à infecção com *Brucella abortus*”

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

Aprovada em de de

Banca Examinadora:

Examinador UFJF

Examinador UFJF

Orientador: Prof. Doutor Gilson Costa Macedo

Juiz de Fora – MG
2014

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre, pela vida e por me cercar de pessoas do bem.

Ao Prof. Dr. Gilson, orientador e amigo, pela dedicação, paciência, conselhos, profissionalismo e por me servir de inspiração quando penso no tipo de profissional que quero ser. Você é o melhor!

À Prof. Dra. Jacy, pelos tantos ensinamentos e risadas ao longo desses 2 anos.

À Prof. Dra. Leda Quércia por ter nos cedido camundongos knockout para a citocina IFN- γ para a execução do trabalho.

Ao Prof. Leonardo Starling que nos ajudou no processo de obtenção da Talidomida.

Aos Profs. Dr. Henrique e Ana Paula bem como Prof. Dr. Marcelo, por nos possibilitar continuar trabalhando mesmo com o nosso laboratório em reforma.

Às melhores alunas de iniciação científica e companheiras de laboratório que eu poderia ter: Letícia, Juliana, Marcela, Bruna e Carol. Vocês me ajudaram muito mais do que possam imaginar e serei sempre grata por isso!

À Dani e Livinha, companheiras de escolhas, por toda ajuda nesse último e pesado ano de mestrado, seja nos experimentos ou nos estudos, e pelos momentos de diversão.

À Popo, que esteve sempre comigo e foi um presente que JF me deu para a vida!

À Mari e Issa, que me acolheram tão bem em JF.

À Andreia pela amizade, fortalecida nesses 2 anos, e por ter sido meu “190” em JF.

À Rosi pelos maravilhosos lanches que melhoravam nossos dias.

Aos amigos do LIDIPO pela boa convivência e amizade!

Aos amigos de laboratório por suavizarem meus dias de trabalho e estudo.

À minha família! Papai, por fazer tudo parecer tranquilo demais aliviando o peso que carregamos. Mamãe, por ser o braço firme que nos guia nos estudos. Glênia, que me acalma só por existir e me fazer ter a certeza de que sempre terei alguém por mim.

Ao Homerinho pelo amor, estímulo e apoio de sempre em todas as minhas escolhas! Marido, amigo e companheiro que soube entender com paciência minha ausência e me deu força para suportar os dias longe.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A Brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella* que infectam o homem e uma grande variedade de animais, principalmente o gado. Em humanos causa febre ondulante, endocardite, artrite e osteomielite enquanto em animais causa aborto e infertilidade. Essa enfermidade é considerada a zoonose mais prevalente no mundo, com mais de 500.000 novos casos relatados por ano. Somente no Brasil, a Brucelose causa um impacto econômico estimado de 32 milhões de dólares ao ano. A resposta imune contra a *Brucella* envolve vários mecanismos da imunidade inata e adquirida entre os quais a citocina IFN- γ , típica do perfil T_H1, e as células T CD8⁺ executam um papel de destaque. IFN- γ ativa macrófagos induzindo a produção de radicais derivados de oxigênio e nitrogênio essenciais no combate ao patógeno, além de ativar células NK. Já os linfócitos T CD8⁺ lisam as células infectadas destruindo o patógeno ou deixando-o vulnerável aos mecanismos extracelulares da imunidade. Assim, estes mecanismos são essenciais para o controle efetivo da infecção. Diversos trabalhos têm mostrado que a Talidomida, um derivado do ácido glutâmico, é capaz de induzir a formação de um perfil T_H1, com elevada produção de IFN- γ , além de co-estimular e induzir a proliferação e produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺. De fato, trabalhos prévios de nosso grupo demonstraram que o tratamento prévio com Talidomida é capaz de aumentar a resistência de camundongos C57BL/6 contra *Brucella*, aliada ao aumento na produção de citocinas (IL-12 e IFN- γ), óxido nítrico e células T CD8⁺. Assim, uma vez que a Talidomida apresenta um amplo espectro de ações, o objetivo deste estudo foi avaliar outros mecanismos imunológicos afetados pela Talidomida e que estejam associados ao aumento da resistência ao patógeno. Nosso foco não é o tratamento com a Talidomida em si, mas embasar o desenvolvimento de novos compostos ou componentes vacinais que auxiliem no combate a esta importante patologia.

Como metodologia, primeiramente foi confirmada a carga bacteriana esplênica uma semana após infecção, em animais previamente tratados com Talidomida. Em seguida a proliferação celular e o perfil de células regulatórias foram determinados em esplenócitos derivados de animais tratados e infectados. Em relação a imunidade inata, a ação da Talidomida foi avaliada através da produção de citocinas (IL-6 e TNF- α) e de óxido nítrico. Por fim, avaliamos a influência da talidomida na sobrevivência de animais "Knockout" para IFN- γ após a infecção por *Brucella* e se o tratamento com a droga é capaz de alterar a proteção induzida pela vacinação com a cepa RB51.

Como resultados, foi percebida uma significativa redução na carga bacteriana de animais tratados com Talidomida em relação aos animais não tratados. Essa redução foi acompanhada de um aumento na proliferação linfocitária e da diminuição no percentual de células T regulatórias. Em relação aos macrófagos, foi percebido um aumento na produção de óxido nítrico em células tratadas com a droga após estímulo com a bactéria. Por fim, o tratamento com Talidomida não foi capaz de conferir maior nível de proteção a animais vacinados com a cepa RB51 e nem modificou o tempo de vida de animais "Knockout" para IFN- γ infectados com *B. abortus*.

Assim, o presente estudo conclui que a talidomida é capaz de potencializar a eliminação da *Brucella abortus in vivo*, e que esta potencialização é dependente da produção de IFN- γ e óxido nítrico, bem como da redução do perfil regulatório.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Brucella* that infects humans and a wide variety of animals, especially cattle. In humans it causes undulant fever, endocarditis, arthritis and osteomyelitis while in animals causes abortion and infertility. This disease is considered the most prevalent zoonosis in the world, with more than 500,000 new cases reported annually. Only in Brazil, Brucellosis causes an estimated economic impact of \$ 32 million annually. The immune response against *Brucella* involves different mechanisms of innate and acquired immunity among which IFN- γ cytokine, typical of T_H1 profile, and CD8⁺ T cells have an important role. IFN- γ activates macrophages by inducing the production of radicals derived from oxygen and nitrogen essential to combat the pathogen and activate NK cells. Already, CD8⁺ lymphocytes lyse infected cells by destroying the pathogen or leaving it vulnerable to extracellular mechanisms of immunity. So, these mechanisms are essential for an effective infection control. Several studies have shown that thalidomide, a derivative of glutamic acid, is able to induce the formation of a T_H1 profile with high production of IFN- γ , and to co-stimulate and induce proliferation and cytokine production by CD8 + T lymphocytes. In fact, previous studies from our group demonstrated that previous treatment with thalidomide is able to increase the resistance of C57BL/6 mice against *Brucella*, coupled with the increase in cytokine production (IL-12 and IFN- γ), nitric oxide and CD8+ T cells. Therefore, since the Thalidomide has a broad spectrum of actions, the objective of this study was to evaluate other immune mechanisms affected by Thalidomide and which are associated with increased resistance to the pathogen. Our focus is not the treatment with thalidomide itself, but undergird the development of new compounds or vaccine components that help in combating this important disease.

As methodology, firstly was confirmed the bacterial load one week after infection in animals previously treated with Thalidomide. Then the profile of regulatory cells and cell proliferation were determined in splenocytes derived from treated and infected mice. Regarding innate immunity, the action of thalidomide was evaluated by the production of cytokines (IL-6 and TNF- α) and nitric oxide. Finally, we evaluated the influence of thalidomide on survival of animals "IFN- γ Knockout" after *Brucella* infection and if the treatment with the drug is able to change the protection induced by vaccination with strain RB51 protection.

As results, it was noticed a significant decrease in bacterial load of animals treated with thalidomide compared to untreated animals. This reduction was accompanied by an increase in lymphocyte proliferation and decrease in the percentage of regulatory T cells. With regard to macrophages, an increase in nitric oxide production in cells treated with the drug was seen after stimulation with bacteria. Finally, treatment with thalidomide was not able to confer higher level of protection to animals vaccinated with RB51 strain and did not change the life of animals "Knockout" for IFN- γ infected with *B. abortus*.

So, this study concludes that thalidomide is able to enhance the elimination of *Brucella abortus* in vivo, and that this enhancement depends on the IFN- γ and nitric oxide as well as the reduction in the regulatory profile.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- APC** – célula apresentadora de antígeno
- BB** - meio de cultura *Brucella* Broth
- BCV** – *Brucella* containing vacúolo
- DMSO**- dimetil sulfóxido
- ELISA**- ensaio de absorção imunoenzimático
- FACS** – do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorting*
- IL-12**- interleucina 12
- IL-2**- interleucina 2
- IL-10**- interleucina 10
- IL-1 β** - interleucina 1 beta
- IL-6**- interleucina 6
- IFN- γ** interferon gama
- IL** – interleucina
- LPS** – lipopolissacarídeo
- mg** – miligramas
- MHC** – complexo de histocompatibilidade principal
- mL** – mililitro
- MyD88** – fator de diferenciação mielóide 88
- NK** – do inglês *natural killer*
- NO** – óxido nítrico
- PAMP** – padrão molecular associado à patógeno
- PBS** – tampão salina fosfato
- Td**- talidomida
- TLR**- Receptor tipo Toll
- TNF- α** - Fator de Necrose Tumoral alfa
- Th1**- T helper 1
- UFC**- Unidade Formadora de Colônia
- μ g**- micrograma
- μ L**- microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais fontes de infecção por *Brucella* em humanos.

Figura 2 - Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo da *Brucella sp.*

Figura 3- Incidência mundial da Brucelose humana.

Figura 4: Localização dos tecidos linfáticos.

Figura 5: Estrutura da Talidomida.

Figura 6: Efeito do tratamento com Talidomida sobre a carga bacteriana presente no baço.

Figura 7: Produção de IL-6 (A), TNF- α (B) e Óxido Nítrico (C) por macrófagos peritoneais tratados com Talidomida.

Figura 8: Índice de proliferação de esplenócitos tratados com Talidomida e infectados com *B. abortus*.

Figura 9: Percentual e número de células regulatórias CD4⁺FoxP3⁺ e CD8⁺FoxP3⁺ no baço.

Figura 10: Avaliação da sobrevivência de animais IFN- γ ^{-/-} tratados com talidomida e infectados com *B. abortus*.

Figura 11: Influência do tratamento com Talidomida na proteção induzida pela vacinação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Brucelose	11
1.1.1 Histórico	11
1.1.2 O gênero <i>Brucella</i>	12
1.1.3 Epidemiologia	16
1.1.4 Patogênese	18
1.1.5 Diagnóstico e tratamento	21
1.2 Resposta Imune contra <i>Brucella</i>	22
1.2.1 Imunidade Inata	22
1.2.2 Imunidade adaptativa	25
1.2.3 Vacinas	27
1.3 Talidomida	28
1.3.1 Histórico	28
1.3.2 Mecanismos de ação	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivo específico	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Animais	35
4.2 Cepas bacterianas	35
4.3 Condições de cultivo bacteriano	35
4.4 Talidomida e Tratamento dos animais	36
4.5 Vacinação	36
4.6 Infecção	36
4.7 Carga bacteriana	37
4.8 Cultura de esplenócitos	37
4.9 Teste de proliferação celular pelo método de MTT	38
4.10 Extração de Macrófagos	38
4.11 Dosagem de Óxido Nítrico	39
4.12 Dosagem de citocinas	39
4.13 Curva de sobrevivência	40
4.14 Análise do percentual das células regulatórias por citometria de fluxo	40
4.15 Análise estatística	41

5 RESULTADOS	42
5.1 Avaliação do efeito do tratamento com Talidomida na carga bacteriana esplênica.....	42
5.2 Avaliação da produção de mediadores inflamatórios por macrófagos tratados com Talidomida em resposta a <i>Brucella abortus</i>	43
5.3 Avaliação da proliferação celular em esplenócitos tratados com Talidomida.....	45
5.4 Análise do percentual das células regulatórias após tratamento com Talidomida.....	47
5.5 Análise da sobrevivência de animais deficientes da citocina IFN- γ tratados com Talidomida e infectados com <i>Brucella abortus</i>	50
5.6 Avaliação da influência do tratamento com Talidomida na proteção induzida pela vacinação com a cepa vacinal RB51	52
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÕES	60
8 REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Brucelose

1.1.1 Histórico

A Brucelose é uma doença antiga que pode ter sido a quinta praga do Egito visto que pode ser rastreada por volta do ano 1.600 antes de cristo (a.C) no Egito. Análises de ossos egípcios antigos, pertencentes a uma era em torno de 750 a.C, já apresentaram evidências de sacroileíte e outras lesões osteoarticulares, complicações comuns da Brucelose (PAPPAS *et al.*, 2007). Há registros de que Hipócrates, em 460 a.C., fazia referência a pacientes com sintomas compatíveis com a brucelose. Pesquisas recentes, realizadas na Itália, revelaram que esqueletos remanescentes de pessoas que sucumbiram a catástrofe do vulcão Vesúvio, na cidade de Herculano, ocorrida no ano 79 da era cristã, apresentavam lesões típicas de brucelose. Uma provável explicação para estas lesões foi proporcionada pela microscopia eletrônica que revelou a presença de cocobacilos compatíveis com *Brucella* em queijos feitos com leite de cabras e que foram encontrados carbonizados em escavações naquela cidade italiana (CAPASSO, 2002).

Em 1887, David Bruce isolou o agente *Micrococcus melitensis* do baço de um soldado britânico que morreu de uma doença febril comum entre os militares estacionados em Malta (Febre de Malta), um arquipélago situado no centro do Mediterrâneo. Apesar disso, por quase 20 anos após o isolamento deste microorganismo, a febre de Malta permaneceu um mistério e foi descrita como uma doença transmitida por vetores (SRIRANGANATHAN *et al.*, 2009).

No ano de 1895, o patologista e veterinário L. F. Bernhard Bang isolou uma bactéria encontrada em fetos abortados de bovinos, denominando-a por isso de *Bacillus abortus* (NICOLETTI, 2002). Posteriormente, estes sintomas foram reproduzidos em novilhas gestantes infectadas experimentalmente e a doença foi chamada de “doença de Bang”. Porém, naquele momento, não foi

estabelecida qualquer relação entre essa doença e a Febre de Malta (PACHECO *et al.*, 1956).

Em 1905, Themistocles Zammit isolou um bacilo semelhante (a *Brucella melitensis*) do leite de cabras. Acreditava-se que as cabras não fossem fonte de infecção, uma vez que elas não ficavam doentes quando inoculadas com culturas do microrganismo. Entretanto, a descoberta de que cabras saudáveis poderiam ser portadoras da doença foi um grande avanço no estudo epidemiológico dessa doença (SRIRANGANATHAN *et al.*, 2009; WYATT, 2005).

Somente em 1918, quando Alice Evans, uma cientista americana, realizou um trabalho clássico sobre bactérias patogênicas em produtos lácteos, é que foi estabelecida a relação entre as espécies causadoras da Febre de Malta e a doença de Bang. O gênero foi então renomeado para *Brucella* em homenagem a seu descobridor David Bruce. A descoberta da *Brucella abortus* em mamíferos marinhos no início de 1990 mudou o conceito da distribuição terrestre da Brucelose, assim como a maior necessidade de medidas de controle da patologia (SRIRANGANATHAN *et al.*, 2009).

1.1.2 O gênero *Brucella*

Bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são pequenos cocabacilos Gram-negativos não capsulados, incapazes de se locomover e de formar esporos além de serem parasitas intracelulares facultativos (PESSEGUEIRO, *et al.*, 2003).

Estes microrganismos pertencem à família α 2-protobacteriacea, composta por uma diversidade de bactérias que variam desde espécies simbióticas, até patógenos extracelulares como *Agrobacterium tumefaciens*, ou intracelulares obrigatórios como *Rickettsia* sp. (TSOLIS, 2002).

O crescimento de bactérias do gênero *Brucella* é, geralmente, aeróbio sendo que algumas espécies necessitam de uma atmosfera com adição de 5 a 10% de CO₂. A temperatura ideal para crescimento é de 37°C, em meio rico, com pH entre 6,6 a 7,4. As colônias de *Brucella* são visíveis em meio sólido entre dois a três dias de incubação, podendo apresentar-se sob a

forma lisa ou rugosa, dependendo da cepa bacteriana, e medindo entre 3 a 4 mm de diâmetro (ALTON *et al.*, 1988).

Historicamente, a classificação de espécies de *Brucella* foi baseada em seu hospedeiro natural de preferência (fonte de isolamento principal) e características fenotípicas como necessidade de CO₂, produção de H₂S, sensibilidade a corante, perfis metabólicos oxidativos e aglutinação com soro anti-monoespecífico. Atualmente, o gênero *Brucella* compreende sete espécies distintas: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*, *Brucella microti* e *Brucella ovis*, que infectam respectivamente, cabras, gado, suínos, ovinos, cães, ratos do deserto e ratazanas comuns. Há ainda duas espécies que infectam mamíferos marinhos, *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis* (SCHOLZ *et al.*, 2008; FOSTER *et al.*, 2007).

As principais espécies patogênicas no mundo são *B. abortus*, responsável pela brucelose bovina, a *B. melitensis*, principal agente etiológico de brucelose em ovinos e caprinos, e a *B. suis* responsável pela brucelose suína (CARDOSO *et al.*, 2006). Dentre as diversas espécies de *Brucella*, quatro merecem especial atenção por apresentarem risco de infecção para humanos: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*. Apesar da *B. melitensis* ser a mais patogênica, a *B. abortus* é a principal fonte de infecção, por ser a espécie mais difundida no mundo (CORBEL, 1997). A *Brucella canis* também é capaz de infectar o homem porém, sua incidência e patogenicidade são relativamente baixas (CARMICHAEL, 1990; SHIN, 1996) **(Figura 1)**.

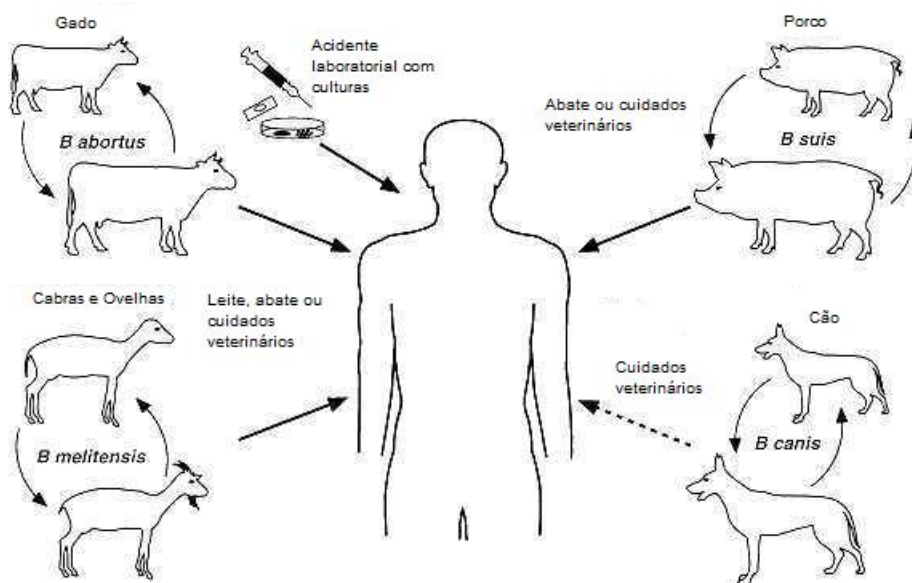


Figura 1 - Principais fontes de infecção por *Brucella* em humanos.

Fonte: <http://www.vetnext.com/search.php?s=aandoening&id=73084447169%20144>

As bactérias do gênero *Brucella*, assim como outras bactérias Gram-negativas, possuem uma membrana celular externa composta de lipopolissacarídeos (LPS), que é considerado um dos principais fatores de virulência deste gênero. Este LPS consiste de três componentes básicos, o lipídeo A, moléculas de açúcar e o antígeno O. A *Brucella* ocorre naturalmente como linhagens de LPS lisas (S-LPS), que são linhagens que possuem o LPS com o antígeno O completo. Já as linhagens de LPS rugoso (R-LPS) não possuem o antígeno O completo em sua constituição (CARDOSO *et al.*, 2006).

Nas espécies patogênicas lisas da *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*), o antígeno-O do LPS tem sido descrito como um importante fator de virulência. Esta proposição é baseada na observação que as cepas lisas sobrevivem e replicam nos animais e em cultura de macrófagos com mais eficiência do que os mutantes rugosos (KREUTZER *et al.*, 1979). Entretanto, sabe-se que *B. ovis* e *B. canis*, as quais são naturalmente rugosas, mostraram-se completamente virulentas nos seus hospedeiros naturais, indicando que o

antígeno-O não é o único fator necessário para a virulência da *Brucella* (SMITH *et.al.*, 1990).

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

Como mostrado na **Figura 2**, o lipídeo A da *B. abortus* possui uma espinha dorsal de diaminoglicose (ao invés de glucosamina), e os grupos acil são mais longos e estão apenas ligados ao núcleo por ligações amida (em vez de ligações éster e amida) (MORIYON, 2003). Esta estrutura não clássica confere ao LPS da *B. abortus* características peculiares que fazem dele um fator de virulência importante. O LPS atípico da *Brucella* apresenta reduzida atividade biológica quando comparado ao LPS de outras bactérias sendo várias centenas de vezes menos imunogênico e tóxico do que o LPS de *E. coli* (LAPAQUE *et al.*, 2005).

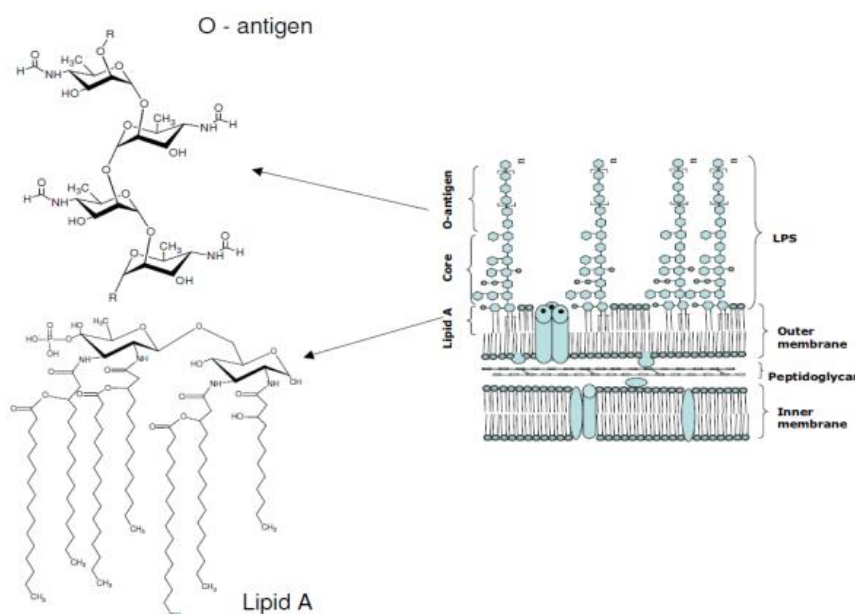


Figura 2 - Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo da *Brucella sp.*
Fonte: CARDOSO *et al.*, 2006.

1.1.3 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Brucelose humana é considerada a zoonose bacteriana mais prevalente no mundo (**Figura 3**), com mais de 500.000 novos casos relatados por ano. Esta enfermidade é encontrada principalmente em países do Mediterrâneo, Ásia Central, Península Arábica, Índia e América Latina, tornando-a amplamente difundida (HARTIGAN, 1997). Entretanto, apesar de sua grande presença nos locais citados, a distribuição geográfica da Brucelose é constantemente modificada, com novos focos de emergência e re-emergência. Além disso, a epidemiologia da Brucelose humana tem mudado drasticamente ao longo dos últimos anos devido a várias razões socioeconômicas e políticas, aliadas ao aumento do tráfego internacional (PAPPAS *et al.*, 2006b).

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

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

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

estejam infectados, o que resulta em uma perda anual próxima de 60 milhões de dólares (SAMARTINO, 2002).

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

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

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

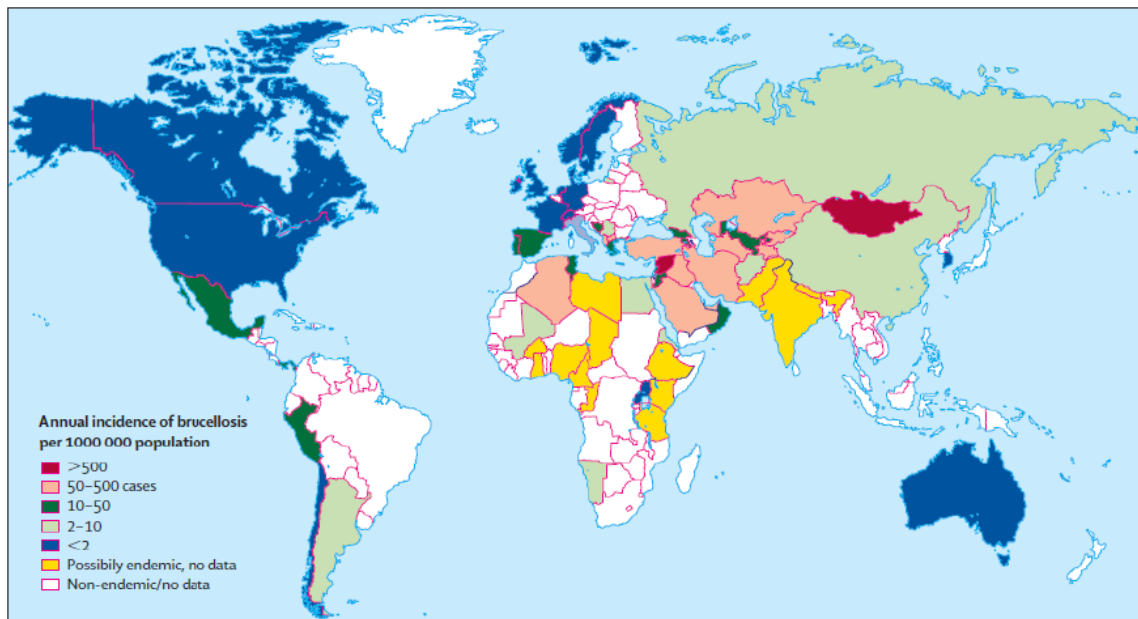


Figura 3- Incidência mundial da Brucelose humana (PAPPAS *et al.*, 2006)

1.1.4 Patogênese

A infecção por *Brucella* ocorre através da pele, conjuntiva, mucosa respiratória ou digestiva (CRAWFORD *et al.*, 1990; KO e SPLITTER, 2003). Este patógeno possui a capacidade de evitar os mecanismos de morte e de proliferar tanto nas células fagocíticas, tais como os macrófagos, quanto em células não fagocíticas, como os trofoblastos (MURPHY *et al.*, 2001). Para ser um agente infeccioso de sucesso, a *Brucella* requer quatro etapas: adesão, invasão, estabelecimento e disseminação dentro do hospedeiro. O contato direto com a célula hospedeira, que permite a adesão e invasão. No interior dos macrófagos, a *Brucella* sobrevive e se multiplica através da inibição da fusão fagossomo-lisossomo e finalmente as bactérias acumuladas são disseminadas para outras células (CHRISTOPHER *et al.*, 2010).

A origem das diversas manifestações clínicas da Brucelose em humanos e animais ainda não foram claramente definidas. Entretanto, não há dúvida que o aumento da replicação do patógeno no hospedeiro está relacionado ao surgimento dos sintomas (Ko & Splitter, 2003). Assim, a patogênese causada pela infecção com a *Brucella* está associada a sua capacidade de evitar mecanismos extracelulares de defesa do hospedeiro, como anticorpos e ativação de proteínas do complemento, e proliferar dentro

dos macrófagos (SANGARI *et al.*, 1996). No interior dos macrófagos, a *Brucella* consegue inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, evitando a sua destruição pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (PIZARO-CERDÁ *et al.*, 1998).

Em relação aos fatores de virulência, conforme relatado anteriormente, a maioria dos estudos tem apontado o LPS, presente na membrana externa da *Brucella*, como sendo o principal fator de virulência deste microrganismo. Porém, outros fatores de virulência também têm sido descritos, tais como o sistema de secreção do tipo IV (Vir B) que transporta seletivamente proteínas e macromoléculas através das membranas, e é essencial para a sobrevivência intracelular da *Brucella* (FRANCO *et al.*, 2007). Acredita-se ainda que, durante a infecção, parte da complexa interação que ocorre entre as membranas do patógeno e do hospedeiro seja mediada por ligações entre o lipídio A da *Brucella* e os receptores *Scavenger*, presentes em microdomínios chamados de lipid rafts, das células do hospedeiro (LAPAQUE *et al.*, 2005).

Em humanos, após a infecção, a bactéria penetra através da mucosa e atinge a corrente sanguínea, permitindo a sua disseminação através do sangue (COLMENERO, 1996). O período de incubação é de geralmente 1 a 3 semanas, mas pode ser por vários meses antes que iniciem os sinais de infecção. A infecção por *B. melitenses* é aguda enquanto que a infecção por outras espécies é de caráter subagudo e prolongado (MANTUR *et al.*, 2007).

O início clínico da brucelose humana desenvolve frequentemente com febre de origem desconhecida. A fase aguda da doença é normalmente acompanhada por bacteremia e propagação do patógeno para vários órgãos sistêmicos, principalmente para os tecidos reticuloendoteliais (baço e fígado). Esta fase é caracterizada por sinais sistêmicos inespecíficos e sintomas clínicos compatíveis com a gripe e com a septicemia, ou seja, febre, fadiga, mal-estar, perda de peso, dores de cabeça, artralgia, mialgia, calafrios e suores. As manifestações clínicas podem ser de caráter osteoarticular, cutânea, gastrointestinal, respiratória, cardiovascular e distúrbios neurológicos, mimetizando muitas outras doenças infecciosas e não infecciosas (MANTUR *et al.*, 2007).

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

Em animais, a infecção por *Brucella* se dá pelo contato do agente com qualquer mucosa, principalmente a mucosa oral. Após a penetração no organismo, há um curto período de bacteremia, e as bactérias se alojam em diversos órgãos, principalmente do sistema linfático (**Figura 4**) (EAGLESOME; GARCIA, 1992; THOEN; ENRIGHT; CHEVILLE, 1993).

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

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

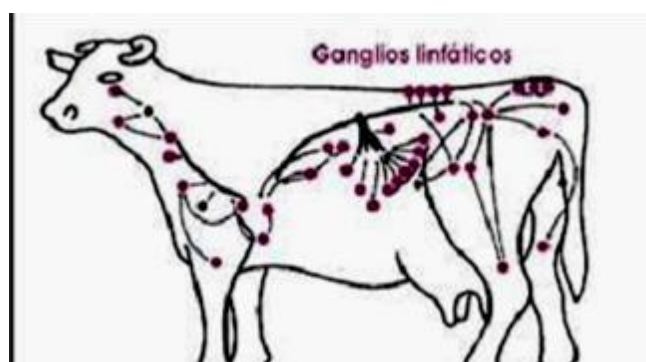


Figura 4: Localização dos tecidos linfáticos. Fonte: adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>, 2003.

Como já explicitado, os principais sinais clínicos observados nos animais infectados estão ligados a problemas reprodutivos. Frequentemente, há retenção placentária e infertilidade temporária ou permanente. Nos machos, a infecção por *Brucella* pode causar orquite com consequente infertilidade por diminuição da qualidade espermática. Lesões articulares e lesões nas glândulas mamárias, também podem ser observadas em casos crônicos da doença (XAVIER *et al.*, 2009). Quando o animal se torna gestante, as bactérias atingem o útero, local pelo qual possuem grande tropismo, induzem reações inflamatórias e provocam, dessa forma, o aborto (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993).

1.1.5 Diagnóstico e tratamento

Os testes diagnósticos para Brucelose podem ser aplicados com diferentes objetivos: confirmação do diagnóstico, estudos de triagem ou prevalência, certificação e, em países onde a Brucelose está erradicada, vigilância para evitar a reintrodução da doença através da importação de animais infectados ou de produtos animais (GODFROID *et al.*, 2010).

Os métodos utilizados para diagnóstico incluem testes diretos, envolvendo análise microbiológica ou detecção do DNA por PCR (Reação em cadeia da polimerase), e testes indiretos, os quais são aplicados tanto *in vitro* (principalmente para leite e sangue) quanto *in vivo* (testes alérgicos). Apesar dos diversos métodos existentes, o isolamento da bactéria e a detecção do DNA da *Brucella* por PCR são os únicos métodos que permitem certeza do diagnóstico (GODFROID *et al.*, 2010).

O tratamento da Brucelose é feito basicamente através da antibioticoterapia produzindo alívio da sintomatologia, diminuição da duração da doença e redução da incidência de complicações. *In vitro*, vários antimicrobianos são ativos contra a *Brucella*, mas nem sempre há correspondência com a sua eficácia clínica devido ao nicho intracelular deste patógeno. Os antimicrobianos mais utilizados são as tetraciclinas, os aminoglicosídeos, a rifampicina, o cotrimoxazol, as quinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração (PESSEGUEIRO, 2003). A combinação de dois

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

1.2 Resposta Imune contra *Brucella*

A interação da *Brucella* com o sistema imunológico humano é fundamental para o desenvolvimento do parasitismo crônico ou para o controle da infecção (BALDWIN; GOENKA, 2006; GOLDING *et al.*, 2001). Por ser um microorganismo intracelular, para que haja uma resposta imune efetiva contra *Brucella abortus*, é necessário que células infectadas sejam capacitadas a destruir o microorganismo invasor ou sejam mortas, permitindo assim a ação de mecanismos extracelulares da resposta imune como anticorpos ou complemento. Assim, a resposta imune do hospedeiro contra a infecção pela *B. abortus* envolve tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa. (GOLDING *et al.*, 2001).

1.2.1 Imunidade Inata

A resposta imune contra bactérias intracelulares como a *Brucella* se inicia com o reconhecimento do microorganismo por células da imunidade inata tais como macrófagos e células dendríticas, conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs). Este reconhecimento ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), dentro os quais se destacam os receptores do tipo Toll (TLRs), presentes na membrana

plasmática destas células ou em compartimentos intracelulares. O reconhecimento da *Brucella* através destes receptores resulta na ativação das APCs e na internalização da bactéria (MACEDO *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2005). Embora ainda não sejam conhecidos todos os TLRs envolvidos no reconhecimento da *B. abortus*, vários trabalhos tem demonstrado o envolvimento dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 (HUANG *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005; WEISS *et al.*, 2005; COPIN *et al.*, 2006, MACEDO *et al.*, 2008). Dentre estes, TLR9 parece ser o mais relevante uma vez que sua ausência leva a um considerável aumento na susceptibilidade à infecção por *Brucella*. Apesar disso, animais deficientes na molécula MyD88, um adaptador fundamental para a sinalização através da maioria dos TLRs, apresentaram uma susceptibilidade ainda mais exacerbada que animais deficientes para TLR9, sugerindo a existência de outros receptores no reconhecimento deste patógeno (MACEDO *et al.*, 2008).

Os macrófagos são elementos chave na resposta imune contra a *Brucella* uma vez que são os principais locais de sobrevivência e replicação da bactéria. Macrófagos ativados estão preparados para a fagocitose e para a destruição do patógeno através de seus produtos bactericidas, tais como as enzimas hidrolíticas degradativas, acidificação do fagolisossomo, defensinas, privação nutricional e explosão oxidativa. Na infecção por *Brucella*, a indução de superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO) são de fundamental importância (BALDWIN; GOENKA, 2006; GROSS *et al.*, 2004). Neste contexto, a citocina IFN- γ , típica do perfil T_H1, possui um papel importante uma vez que é capaz de ativar os macrófagos induzindo a produção destes diversos mediadores imunológicos e assim limitar a infecção pela *Brucella*. Ao serem estimulados pelo microrganismo, os macrófagos são capazes de produzir diversos tipos de citocinas e quimiocinas, dentre as quais a IL-12, o TNF- α e a IL-6. A IL-12 é capaz de induzir a formação de um perfil de resposta do tipo T_H1 caracterizado pela intensa produção da citocina IFN- γ , que, conforme já explicitado, possui um papel importante em ativar os macrófagos, sendo apontada como a citocina de maior relevância no combate a este patógeno (MURPHY *et al.*, 2001).

O TNF- α também se mostrou importante em eliminar a bactéria em culturas de macrófagos por agir principalmente estimulando o recrutamento neutrófilos e monócitos para locais de infecção além de ativar estas células para destruir microorganismos (JIANG *et al.*, 1993). Zhan e colaboradores (1996) demonstraram que depleção de TNF- α através da injeção de anticorpos monoclonais exacerbava a infecção com *B. abortus* aumentando significativamente o número de bactérias no baço ou fígado. Além disso, estes autores evidenciaram que TNF- α está envolvido também na patologia da infecção uma vez que animais depletados não apresentavam esplenomegalia ou acúmulo excessivo de células no baço.

O papel das células dendríticas (DCs) contra à *Brucella* tem sido objeto de investigação nos últimos anos. Foi estabelecido que a *Brucella* invade eficientemente as DCs humanas derivadas de monócitos, crescem bem em seu interior e são capazes de evitar a maturação das DCs e a apresentação de antígeno (BILLARD; DORNAND; GROSS, 2007). Além disso, as DCs humanas infectadas são pobres indutoras da proliferação de linfócitos T naives, devido à baixa produção de IL-12, o qual é essencial na condução da resposta imune do tipo T_H1 (BILLARD *et al.*, 2007; SKENDROS *et al.*, 2011).

As células Natural Killer (NK), também fazem parte da primeira linha de defesa contra patógenos e sua ativação pode matar os alvos infectados ou estimular a atividade microbicida de fagócitos através da produção de IFN- γ (GOLDING *et al.*, 2001). A *Brucella* é capaz de ativar as células NK, através da ativação de APCs para liberar IL-12. A IL-12 por sua vez, leva as células NK a se tornarem células matadoras e a secretarem IFN- γ que, juntamente com a IL-12, exerce um papel no estabelecimento de uma resposta do tipo T_H1 (BIRON, 1999; GOLDING *et al.*, 2001). Devido a sua ação, acreditava-se que as células NK também fossem fundamentais na proteção contra à *Brucella*, porém, a remoção das células NK *in vivo* não alterou a habilidade de camundongos em conter a infecção, sugerindo que outros mecanismos são suficientes para o controle da infecção, mesmo na ausência de células NK (FERNANDES; BENSON; BALDWIN, 1995).

O sistema do complemento também pode atuar na resposta imune contra a *Brucella*. As proteínas do complemento podem opsonizar o patógeno e potencializar a imediata eliminação das bactérias que ainda estejam no ambiente extracelular, além de promover sua fagocitose. As proteínas do complemento podem ainda interagir com a bactéria que esteja opsonizada por anticorpos, aumentando ainda mais sua ação (CORBEIL *et al.*, 1988).

1.2.2 Imunidade adaptativa

A resposta imune adaptativa na brucelose pode ser classificada em três mecanismos. Primeiro, a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e CD8⁺ ativam a função bactericida em macrófagos a fim de dificultar a sobrevivência intracelular da *Brucella*. Segundo, a citotoxicidade exibida pelas células T CD8⁺ matam os macrófagos infectados pelo patógeno. Terceiro, os anticorpos induzidos pelo perfil T_H1, como IgG2a e IgG3, opsonizam o patógeno facilitando a fagocitose e a lise intracelular (MARTIROSYAN; GORVEL, 2013).

Linfócitos T apresentam duas grandes subpopulações: células T helper (T_H) CD4⁺ e células T citotóxicas CD8⁺. Após ativação, estas células se diferenciam em células T efetoras ou de memória programadas para secretar diferentes padrões de citocinas. Os linfócitos do tipo T_H1 secretam IFN- γ como principal citocina efetora contra infecções causadas por bactérias intracelulares, incluindo a *Brucella* (JONES *et al.*, 1992). Esta citocina possui duas principais funções no controle da brucelose: (1) ativa os macrófagos a produzirem reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, além de enzimas capazes de destruir as bactérias fagocitadas; e (2) estimula a produção de subclasses de anticorpos, como IgG2a em camundongos, ativando o sistema de complemento e opsonizando a bactéria de forma a facilitar a fagocitose e favorecer as funções efetoras dos macrófagos (ABBAS *et al.*, 2005). A importância do IFN- γ na resposta imune contra *Brucella* pode ser exemplificada pelo trabalho de Murphy e colaboradores (2001). Usando camundongos deficientes para IFN- γ estes autores demonstraram um

aumento de cerca de 100 vezes no número total de bactérias no baço após 6,5 semanas de infecção quando então os animais sucumbiam à infecção.

Linfócitos T CD8⁺ também participam da resposta imune contra a *Brucella*. Estas células se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs) após o reconhecimento antigênico associado a moléculas de MHC de classe I. Após a diferenciação, estas células reconhecem e eliminam células alvo infectadas através da liberação de proteínas citotóxicas (como perforina e granzima). Além disso, os CTLs são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ e TNF- α , que ativam os fagócitos (ABBAS *et al.*, 2005). A contribuição destas células no controle da brucelose foi efetivamente determinada por Oliveira & Splitter (1995). Utilizando animais deficientes para as moléculas de MHC de classe I ou de classe II, estes pesquisadores mostraram que a brucelose murina foi exacerbada em camundongos que não apresentavam resposta através dos linfócitos T CD8⁺ (MHC classe I) quando comparada a animais normais ou deficientes na resposta por células T CD4⁺ (MHC classe II), evidenciando claramente o impacto das células T CD8⁺ na imunidade mediada por células no controle da brucelose experimental.

Recentemente, trabalhos realizados por Brandão e colaboradores (2012) confirmaram a importância da resposta T_H1 e das células T CD8⁺ no combate a infecção por *Brucella*. Neste estudo, os autores avaliaram a susceptibilidade de animais deficientes para a molécula β 2-microglobulina (componente do MHC de classe I) e da citocina IL-12. Conforme esperado, animais deficientes destas moléculas apresentaram elevada susceptibilidade a *B. abortus* quando comparado aos animais normais. Além disso, essa maior susceptibilidade foi relacionado a menor produção de IFN- γ e a incapacidade dos linfócitos em lisar macrófagos infectados com *Brucella*, confirmando assim o importante papel executado por esses componentes no combate a Brucelose. Apesar disso, esses autores demonstraram que animais deficientes de IFN- γ foram ainda mais susceptíveis a infecção que animais deficientes de IL-12 e de linfócitos T CD8⁺ juntos. Esses achados evidenciam novamente a grande importância do IFN- γ no combate ao patógeno.

A resposta imune humoral também contribui para a eliminação do patógeno, porém de forma pouco efetiva. Embora os anticorpos possam opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção (CHEERS *et al.*, 1983), tornando a fagocitose mais eficiente (WINTER *et al.*, 1989), eles não são capazes de reduzir a taxa de crescimento intracelular da bactéria *in vivo*, e não conferem resistência a animais suscetíveis. A habilidade do patógeno de sobreviver e replicar no interior das células torna-o inacessível aos mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS *et al.*, 1983). Dessa forma, a proteção efetiva contra a infecção fica dependente da imunidade celular (ARAYA *et al.*, 1989).

1.2.3 Vacinas

A vacinação animal é considerada um dos métodos mais práticos e eficazes na redução da incidência da doença, uma vez que não existem formas eficazes de imunização em humanos. As vacinas vivas atenuadas são efetivamente utilizadas nos programas de controle da brucelose. Dentre as vacinas existentes duas delas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), são as mais empregadas: a vacina com a cepa lisa S19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes com a cepa rugosa RB51. Ambas são boas indutoras de imunidade celular (MORIYÓN *et al.*, 2004).

A vacina S19 é uma amostra de *B. abortus* lisa, que foi isolada do leite de vaca em 1923 e desde 1930 tem sido utilizada como vacina, tendo sido empregada em diversos países que erradicaram a doença. Por ser uma amostra lisa, a S19 induz a formação de anticorpos específicos contra o LPS liso, podendo interferir no diagnóstico sorológico da brucelose (CRASTA *et al.*, 2008; SCHURIG; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

Já a vacina utilizando a cepa RB51, é elaborada com uma amostra de *B. abortus* rugosa, originada da amostra lisa virulenta S2308 que sofreu passagens sucessivas em meio contendo concentrações subinibitórias de rifampicina. Possui características de proteção semelhantes às da S19,

porém, por ser uma amostra rugosa, não induz a formação de anticorpos anti-LPS liso e não interfere no diagnóstico sorológico da doença (STEVENS *et al.*, 1994).

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

1.3 Talidomida

1.3.1 Histórico

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

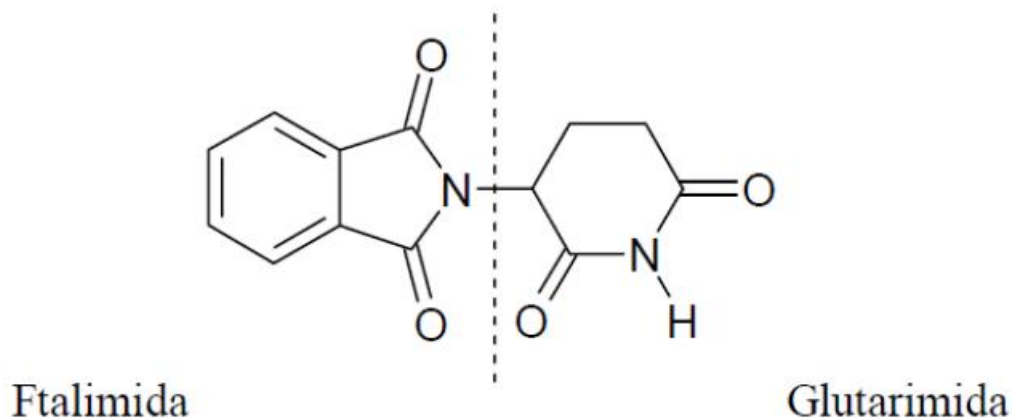


Figura 5: Estrutura da Talidomida (BORGES ; FRÖEHLICH, 2003).

A Talidomida foi inicialmente desenvolvida no ano de 1956 como um anticonvulsivante para o tratamento da epilepsia. Entretanto, devido a sua baixa eficiência como antiepilético, este composto foi eventualmente comercializado como um medicamento contra a insônia e foi também amplamente utilizado por mulheres durante a gravidez como antiemético (RANDALL, 1990; TSENG *et al.*, 1996).

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

Após vários anos de proibição, a indústria Norte-Americana Celgene, baseada em novas descobertas das propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras da Talidomida, solicitou ao FDA (Food and Drug Administration - Administração de Alimentos e Medicamentos) sua aprovação para uso no tratamento da hanseníase, que foi concedida em julho de 1998.

Marcava-se então o renascimento deste fármaco, que representa, atualmente, um dos principais agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento efetivo de diversas doenças, tais como lepromas, artrite reumatoide, doença de Crohn, câncer e AIDS (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001).

Recentemente, a Talidomida tem recebido considerável atenção da comunidade científica devido as suas propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias e anti-angiogênicas sendo utilizada no tratamento de eritema nodoso hansêmico, na artrite reumatóide, tuberculose crônica, doença de Crohn, Lúpus eritematoso além de diversas formas de câncer (KARROW *et al.*, 2003).

1.3.2 Mecanismos de ação

Estruturalmente a Talidomida contém dois anéis amida e um único centro quiral e é formulada como uma mistura racêmica de dois enantiômeros ativos S(-) e R(+). Inicialmente, a isoforma S(-) era tida como o enantiômero primariamente responsável pelos efeitos teratogênicos e a isoforma R(+) pelas propriedades sedativas. Porém, mais tarde, verificou-se que ambas as formas possuem o potencial teratogênico (MELCHERT; LIST, 2007).

Quando administrada como uma mistura racêmica, a Talidomida possui propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras que provavelmente estão associadas a sua capacidade de afetar a produção de citocinas e função celular (ERIKSSON *et al.*, 2000; ERIKSSON *et al.*, 1998).

A Talidomida é um potente inibidor da produção de TNF- α por monócitos humanos estimulados por LPS. Essa inibição é devido, principalmente, ao aumento da degradação do RNA mensageiro do TNF- α por esta droga. Os níveis de outras citocinas como IL-1 β , IL-6 e fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), também sofrem interferência pela ação da Talidomida assim como a produção de IL-10 (NOMAN *et al.*, 2009). Por diminuir a concentração de TNF- α , o qual induz a expressão de moléculas de adesão de superfície celular como ICAM-1, VCAM-1, L-selectina e E-selectina de células endoteliais, a talidomida

bloqueia a cascata de adesão e causa efeitos antivasculares que ocorrem em algumas patologias como no mieloma múltiplo (GEITZ; HANDT; ZWINGENBERGER, 1996). A Talidomida possui ainda um mecanismo de ação anti-proliferativo, através da inibição da produção de IL-6, além de apresentar atividade pró-apoptótica (MITSIADES *et al.*, 2002).

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

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

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

Em 2003, Karrow e colaboradores realizaram uma investigação para avaliar se a Talidomida poderia modular seletivamente a resposta imune e levar ao aumento ou queda da resistência a vários patógenos ou tumores. Surpreendentemente, este estudo demonstrou que o tratamento com Talidomida é capaz de aumentar significativamente a resistência do hospedeiro à infecção por *Listeria monocytogenes* e ao melanoma B16F10, mas não afeta a função do Sistema Fagocítico Mononuclear ou a resistência do hospedeiro ao *Plasmodium yeolii*, *Streptococcus pneumoniae* ou *PYB6 fibrosarcoma*. Em concordância com os achados de Karrow e colaboradores (2003), estudos realizados por Guo *et al.* (2005) avaliando o efeito modulatório da Talidomida sobre o sistema imune com foco sobre os neutrófilos, demonstraram que o tratamento com Talidomida por 15 dias é capaz de aumentar o número de neutrófilos no baço e no fígado de animais infectados por *Listeria*.

Embora o exato mecanismo de ação da Talidomida não seja totalmente claro, é provável que os efeitos modulatórios da Talidomida atuem em diferentes componentes do sistema imune e variem de acordo com o tipo de infecção presente.

2 JUSTIFICATIVA

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

A Talidomida é um derivado sintético do ácido glutâmico que possui atividade anti-inflamatória, imunomodulatória e anti-angiogênicas. Diversos estudos tem evidenciado que a Talidomida é capaz de co-estimular células T induzindo sua proliferação, produção de citocinas e atividade citotóxica, além estar relacionada a formação de uma resposta T_H1 com elevada produção de $IFN-\gamma$. Desta forma, a Talidomida é capaz de agir sobre elementos chaves da resposta imune envolvidos na eliminação de patógenos intracelulares como a *Brucella*.

Em concordância, trabalhos recentes de nosso grupo demonstraram que o tratamento prévio com Talidomida é capaz de potencializar a resposta imune contra a *Brucella*, aumentando a eliminação do patógeno e induzindo uma maior produção de $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e, conseqüentemente, de Óxido Nítrico. Apesar disso, muitas questões relativas aos mecanismos causadores deste aumento na resistência ao patógeno ainda permanecem sem resposta. Assim, o presente trabalho se justifica na tentativa de elucidar outros mecanismos imunológicos que também sejam afetados pelo tratamento com Talidomida e que auxiliem no combate a *Brucella abortus*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar mecanismos imunológicos responsáveis pelo aumento da resistência de animais tratados com Talidomida frente à infecção por *Brucella abortus*.

3.2 Objetivo específico

- Avaliar a carga bacteriana presente no baço de animais infectados e tratados com Talidomida
- Avaliar a concentração de citocinas e de Óxido Nítrico produzidos por macrófagos peritoneais tratados com Talidomida e estimulados com *Brucella abortus*
- Avaliar a capacidade da Talidomida de restaurar a proliferação de linfócitos provenientes de animais infectados com *B. abortus*.
- Avaliar a influência do tratamento com Talidomida no percentual e número de células regulatórias em animais infectados com *B. abortus*.
- Avaliar a influência do tratamento com Talidomida na sobrevivência de camundongos knockout para a citocina IFN- γ infectados com *B. abortus*;
- Avaliar a influência do tratamento com Talidomida na proteção induzida pela vacinação com a cepa RB51 de *B. abortus*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 8 e 10 semanas, pesando cerca de 18 a 20 gramas, oriundos do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e mantidos no Biotério do laboratório de Imunologia da Universidade de Juiz de Fora com água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Foram utilizados também camundongos knockout para a citocina IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Leda Quércia da Universidade Federal de Minas Gerais. Esses animais foram acondicionados em gaiolas plásticas microisoladoras, mantendo todo o ambiente estéril, incluindo água e ração.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação animal (CEEAA) da Pró-reitoria de pesquisa/UFJF sob o número de protocolo 033/2012.

4.2 Cepas bacterianas

Utilizou-se neste estudo a cepa lisa S2308 (virulenta) e a cepa rugosa RB51 (vacinal) da *Brucella abortus* disponíveis em nosso laboratório.

4.3 Condições de cultivo bacteriano

A cepa S2308, que foi utilizada na infecção ou como antígeno na cultura de células, bem como a cepa RB51, utilizada na vacinação, foram cultivadas em meio *Brucella Broth* líquido (BB) (DIFCO), a 37°C sob agitação constante. Após três dias de crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada e o sedimento foi ressuscitado em tampão salina fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,4 (2,8 mM Na₂PO₄; 7,2 mM Na₂HPO₄; 0,14 M NaCl). Alíquotas destas culturas foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio BB solidificado com 1,5% de ágar bacteriológico. Após incubação por 72 horas a

37°C foi possível determinar a concentração bacteriana presente na suspensão por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) visualizadas na placa.

4.4 Talidomida e Tratamento dos animais

O composto Talidomida utilizado neste estudo foi fornecido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) após autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – “Autorização especial para estabelecimento de ensino e pesquisa” Nº 009/2013.

O protocolo de tratamento baseou-se na administração intraperitoneal de uma suspensão aquosa de Talidomida (300µL/animal) na concentração 150mg/Kg/dia (QUEIROZ *et al.*, 2013) durante 7 dias. Como controles foram utilizados animais que receberam PBS (300µL/animal/dia).

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

4.5 Vacinação

Após o tratamento, um grupo de animais foi vacinado intraperitonealmente com 1×10^8 UFC da cepa rugosa RB51 da *B. abortus*. Após 6 semanas, os animais vacinados foram infectados com a cepa virulenta, conforme descrito abaixo.

4.6 Infecção

Vinte e quatro horas após a realização do protocolo de tratamento, os animais tratados ou controles foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC da cepa virulenta S2308 da *B. abortus*. Uma semana após a infecção, esses camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada do baço e determinação da carga bacteriana.

Os grupos vacinados foram infectados somente 6 semanas após a vacinação. O sacrifício ocorreu por deslocamento cervical após duas semanas da infecção também para a extração do baço e determinação da carga bacteriana.

4.7 Carga bacteriana

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

4.8 Cultura de esplenócitos

As suspensões de células obtidas após a maceração dos baços foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 600g. Posteriormente, o sobrenadante do centrifugado foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão ACK (1% KHCO₃ e 8% NH₄Cl em água destilada) e incubadas por 5 minutos, a temperatura ambiente, ocorrendo a lise osmótica dos eritrócitos. Após a incubação, 28 ml de PBS foram acrescentados e seguiu-se nova centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO). Em seguida a concentração das células foi determinada na câmara de Neubauer.

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC) e estimuladas com *B. abortus* S2308 (MOI de 100:1). Células não estimuladas (meio) foram usadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5,0 µg/mL - Sigma) serviram como controle positivo. Após 72 horas de incubação à 37°C e sob

atmosfera com 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e os esplenócitos submetidos ao ensaio de MTT.

4.9 Teste de proliferação celular pelo método de MTT

Para avaliar o índice de proliferação celular de esplenócitos provenientes de animais tratados ou não com Talidomida e estimulados com Concanavalina A, os sobrenadantes das culturas destas células foram removidos cuidadosamente e adicionados 100 µl de meio RPMI (GIBCO) suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO), em cada poço. Em seguida foram acrescentados 10 µl/poço de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium bromido (MTT), preparado à 5mg/ml em H₂O. Seguiu-se então uma incubação em estufa à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂ por 4h. Após esse período, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente para adição de 100 µl de DMSO. Finalizado o processo, foi realizada leitura em espectrofotômetro à 550nm. O índice de proliferação foi calculado levando-se em conta a metabolização do MTT de células estimuladas e células não estimuladas.

4.10 Extração de Macrófagos

Para a obtenção de macrófagos oriundos de animais limpos, camundongos C57BL/6 receberam intraperitonealmente 2mL de Tioglicolato à 3%. Após 72 horas, esses animais foram sacrificados por deslocamento cervical, retirou-se a pele sobre o peritônio e injetou-se 5mL de PBS gelado. Realizou-se massagem peritoneal para recrutamento de macrófagos e, em seguida, aspirou-se o PBS com o auxílio de seringa e agulha. Essas células foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO). Em seguida a concentração das células foi determinada na câmara de Neubauer.

A cultura foi feita em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) e incubadas por 24h em estufa à 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos foram lavados a fim de retirar as células não aderidas e tratados por duas horas com Talidomida nas concentrações de 50, 100 ou 500 mg. Ao final do tempo de tratamento, foram adicionados os estímulos *B. abortus* (10^2 bactérias/célula) ou LPS de *E. coli* (1 µg/mL-Sigma). Seguiu-se então uma nova incubação por 24 horas a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂. Ao final deste período o sobrenadante foi coletado para avaliação da produção de citocinas e de Óxido Nítrico.

4.11 Dosagem de Óxido Nítrico

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

4.12 Dosagem de citocinas

Para determinação da concentração das citocinas IL-6 e TNF- α nos sobrenadantes de cultura de macrófagos, foi realizado o teste ELISA do tipo sanduiche usando kits comerciais (R&D Systems) conforme o protocolo do fabricante. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

4.13 Curva de sobrevivência

Para avaliar a influência do tratamento com Talidomida na sobrevivência dos camundongos à infecção por *B. abortus*, foram utilizados camundongos knockout para a citocina IFN- γ . Estes animais foram tratados com Talidomida (150mg/Kg/dia) durante sete dias e infectados 24 horas após o término do tratamento com *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal) (QUEIROZ *et al.*, 2013). Como controles foram utilizados animais IFN- $\gamma^{-/-}$ tratados somente com solução salina e animais C57BL/6 tratados com Talidomida ou com solução salina, todos infectados após 24 horas do tratamento. Cada grupo foi composto por 6 animais e o experimento foi realizado duas vezes.

4.14 Análise do percentual das células regulatórias por citometria de fluxo

Para avaliar o percentual de células regulatórias, camundongos C57BL/6 (quatro por grupo) foram infectados com *B. abortus* (1×10^6 bactérias/animal). Após uma semana de infecção esses animais foram sacrificados para extração de esplenócitos conforme previamente descrito. Após a determinação da concentração celular em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em placas de 96 poços de fundo em “U” (SARSTEDT) e iniciou-se o processo de marcação celular.

A marcação foi feita com kit específico para FoxP3 (Mouse FoxP3 Buffer Set – Becton & Dickinson). Primeiramente as placas contendo as células foram centrifugadas a 250g por 10 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa. As células foram então ressuspendidas em 100 μ l de tampão de FACS (PBS com 1% de soro fetal bovino e 0,09% de azida (NaNO₃)). Em seguida, as placas de cultura foram submetidas a nova centrifugação (250g, 10 minutos) e foram adicionados, a cada poço, 20 μ L de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 (Becton & Dickinson) na concentração de 0,5 μ g por poço. Estes anticorpos apresentavam as marcações Cy7, FITC e APC respectivamente. Seguiu-se então uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e acrescentou-se 200 μ l/poço de tampão de FACS

seguida de centrifugação (250g, 10 minutos). O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200µl do tampão de fixação (Fixation Buffer) e incubadas por 30 minutos a 4°C. Seguiu-se nova centrifugação a 500g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 200µl de tampão de permeabilização (Permeabilization Buffer) pré-aquecido (37°C). As placas foram novamente centrifugadas (500g, 5 minutos), o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 200µl de tampão de permeabilização pré-aquecido novamente. Foi realizada a incubação por 30 minutos a 37°C. Em seguida a placa foi submetida a nova centrifugação (500g, 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e foram adicionados , a cada poço, 20µL de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpos anti-FoxP3 (PE). Seguiu-se uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. Acrescentou-se 200µl/poço de tampão de FACS seguida de centrifugação (500g, 5 minutos), sendo esse procedimento realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em 250µl de tampão de FACS e transferidas para tubos específicos para FACS (CORNING). As amostras foram coletadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 50.000 eventos foram adquiridos.

Os resultados foram analisados pelo software FCS express (De Novo Software). A zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células e o número e percentual de células CD4⁺FoxP3⁺ ou CD8⁺FoxP3⁺ foi determinado.

4.15 Análise estatística

Os dados obtidos através dos ensaios de ELISA e da contagem de UFC do baço dos camundongos foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc), através do teste *t* de Student, sendo considerado significativas as análises com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito do tratamento com Talidomida na carga bacteriana esplênica.

Trabalhos recentes de nosso grupo demonstraram que o tratamento prévio com Talidomida na concentração de 150mg/Kg/dia durante sete dias foi capaz de diminuir o número de unidades formadoras de colônias recuperadas no baço de animais infectados. Para confirmar este resultado, animais C57BL/6 foram tratados com Talidomida nesta mesma concentração e infectados com *Brucella abortus* S2308, um dia após o tratamento. Conforme mostrado na **Figura 6**, e em concordância com os resultados anteriores, o tratamento foi capaz de potencializar a eliminação do patógeno, reduzindo em cerca de 10 vezes o número de bactérias recuperadas no baço, após uma semana de infecção. Este resultado confirma, mais uma vez, que a Talidomida apresenta potencial para melhorar a resposta imune do hospedeiro no controle da infecção por *Brucella abortus*.

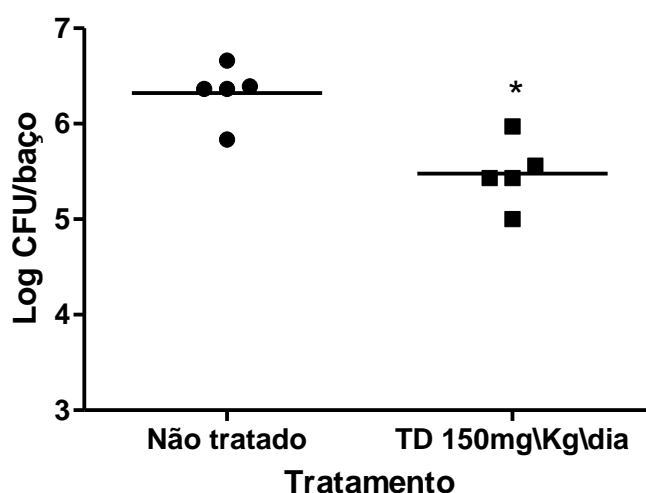


Figura 6: Efeito do tratamento com Talidomida sobre a carga bacteriana presente no baço. Camundongos C57BL/6 foram tratados por 7 dias com Talidomida na concentração de 150mg/kg/dia. Após o tratamento, os animais foram infectados intraperitonealmente com 10^6 bactérias e sacrificados após uma semana de infecção. Como controles foram utilizados animais que não receberam tratamento com Talidomida. A carga bacteriana foi determinada no baço e apresentada como log do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/baço. (*) Diferença significativa em relação ao grupo não tratado ($p < 0,05$).

5.2 Avaliação da produção de mediadores inflamatórios por macrófagos tratados com Talidomida em resposta a *Brucella abortus*.

Ativação de macrófagos representa um dos primeiros eventos da resistência inata à infecção intracelular. Patógenos como a *Brucella* são fagocitados pelos macrófagos e através de moléculas de superfície como o LPS, ativam estas células levando-as a produzir uma série de substâncias que vão contribuir para o controle e destruição do microrganismo invasor. Dentre estas substâncias, as citocinas, IL-6 e TNF- α , assim como o Óxido Nítrico têm demonstrado ser de essencial importância para resistência a este tipo de infecção intracelular. Em contrapartida, trabalhos de diferentes grupos tem evidenciado que a Talidomida possui características anti-inflamatórias, sendo capaz de reduzir a produção destes mediadores imunológicos quando estimulados por LPS (NOMAN et al., 2009). Apesar disso, como a Talidomida tem sido capaz de aumentar a eliminação da *Brucella*, possíveis alterações na produção de IL-6, TNF- α ou Óxido Nítrico foram avaliadas em macrófagos inflamatórios tratados com Talidomida e estimuladas com a bactéria viva ou com LPS. Para isso, macrófagos peritoneais foram cultivados e tratados por duas horas com Talidomida em diferentes concentrações (50, 100 e 500 $\mu\text{g/ml}$) e estimulados com a bactéria ou com LPS. Após 24 horas de incubação, a produção dos mediadores inflamatórios foi determinada.

Conforme demonstrado na **Figura 7**, o estímulo com LPS foi capaz de induzir a produção de IL-6, TNF- α e Óxido Nítrico por macrófagos inflamatórios e esta produção foi diminuída quando as células foram tratadas previamente com Talidomida. Entretanto, de forma surpreendente, a Talidomida não foi capaz de diminuir a produção destes mediadores inflamatórios na presença da bactéria, mesmo quando foram usadas concentrações mais elevadas (500 $\mu\text{g/ml}$). Além disso, a análise da produção de Óxido Nítrico revelou um fato surpreendente: em resposta a *Brucella*, o tratamento com Talidomida induziu um aumento na concentração deste mediador. Esses resultados sugerem que o estímulo com a *Brucella* pode ser suficientemente forte na indução IL-6 e TNF- α não sendo por isso afetado pelo tratamento com a Talidomida. Além disso, estes resultados também nos

permitem inferir que a *Brucella* é capaz de induzir a produção destes mediadores inflamatórios utilizando vias diferentes do LPS e que não são afetadas pelo tratamento com Talidomida. Por fim, o surpreendente aumento na produção de NO encontrado em macrófagos tratados com Talidomida poderia ser o responsável pela maior eficiência na eliminação do patógeno, explicando a menor carga bacteriana recuperada em animais tratados e infectados.

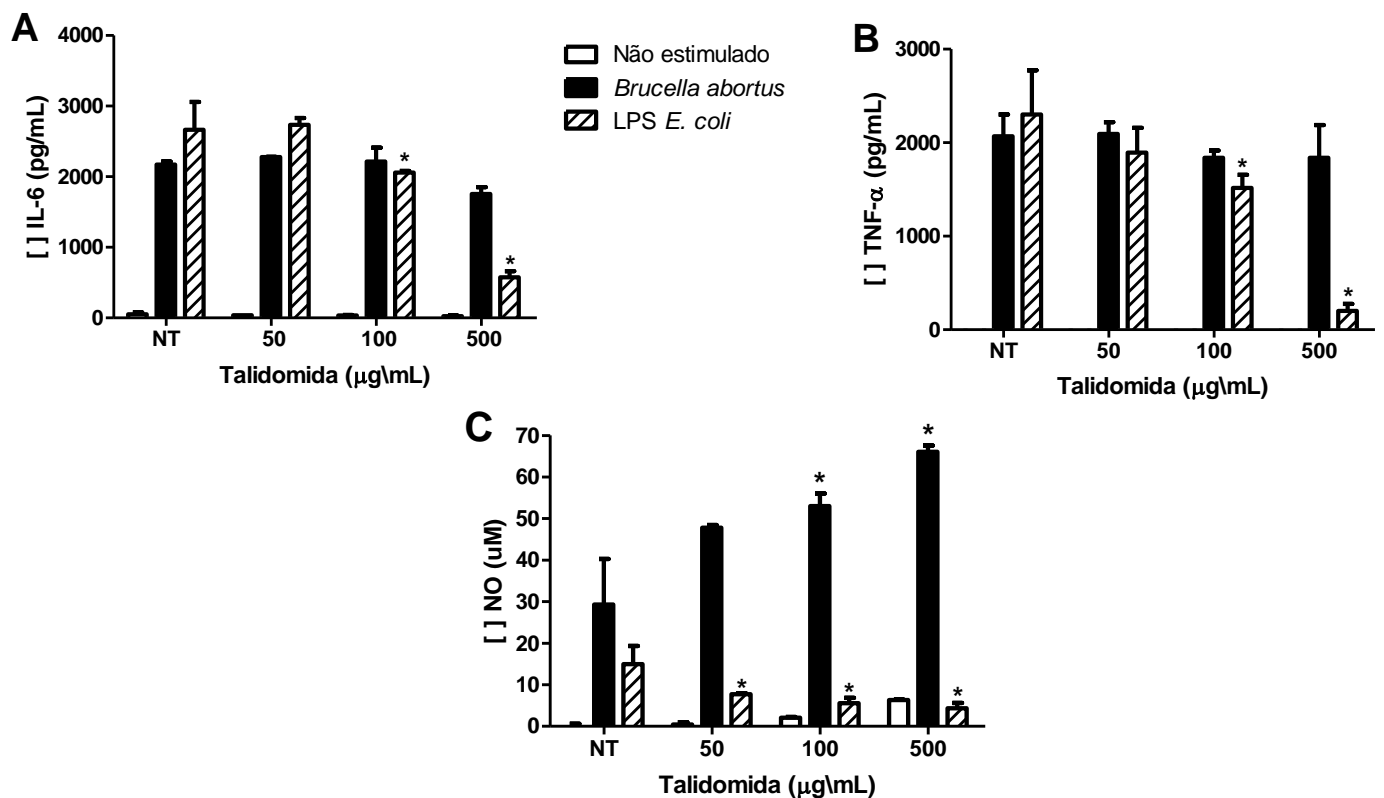


Figura 7: Produção de IL-6 (A), TNF-α (B) e Óxido Nítrico (C) por macrófagos peritoneais tratados com Talidomida. Macrófagos peritoneais foram extraídos, tratados com Talidomida por 2 horas e estimulados com *B. abortus* (10^3 bactérias/célula) ou LPS de *E.coli* ($1\mu\text{g/ml}$). Como controles foram utilizadas células não submetidas ao tratamento ou células tratadas mas não estimuladas. Após 24 horas de cultivo, a concentração de citocinas no sobrenadante foi determinada por ELISA enquanto a produção de Óxido Nítrico foi determinada pelo método de Griess (*) diferença significativa em relação às células não tratadas. $p < 0,05$

5.3 Avaliação da proliferação celular em esplenócitos tratados com Talidomida

Diferentes trabalhos têm evidenciado que a infecção aguda por *B. abortus* é capaz de induzir uma imunossupressão temporária, baseada principalmente na ausência de resposta de células T. Este fato tem sido evidenciado pela diminuição na proliferação celular em resposta a mitógenos como a Concanavalina A (Spera *et al.*, 2006; Rodrigues-Zapata *et al.*, 1996). Assim, uma vez que a Talidomida é capaz de induzir a produção de IL-2 e consequente proliferação celular (HASLETT *et al.*, 1998), avaliamos se o tratamento com esta droga é capaz de reverter a imunossupressão induzida pela infecção com *B. abortus*.

Conforme explicitado na **Figura 8**, esplenócitos oriundos de animais não infectados exibem intensa proliferação celular quando estimulados com o mitógeno Concanavalina A. Entretanto, conforme esperado, esplenócitos de animais infectados por uma semana com a *Brucella abortus* S2308 não são capazes de responder da mesma maneira ao mitógeno, apresentando reduzido índice de proliferação. Em contrapartida, o tratamento prévio com Talidomida por sete dias antes da infecção parece reverter, pelo menos de forma parcial, a imunossupressão induzida pela bactéria, aumentando de forma significativa a proliferação celular. Estes resultados poderiam justificar o aumento na produção de IFN- γ encontrada nos estudos de Queiroz e colaboradores (2012) visto que o tratamento poderia aumentar o número de células produtoras desta citocina.

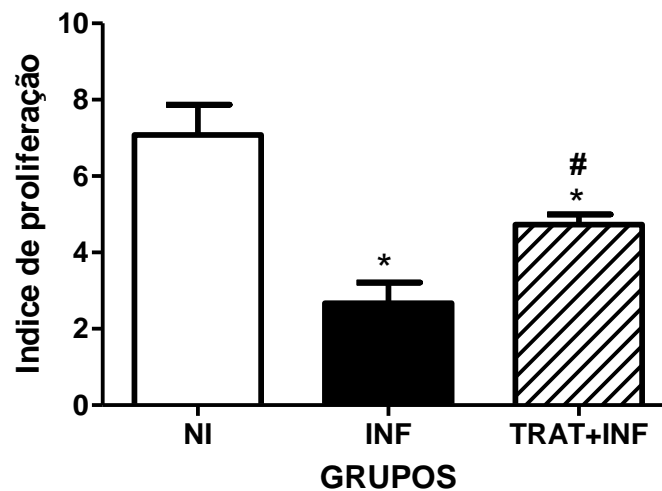


Figura 8: Índice de proliferação de esplenócitos tratados com Talidomida e infectados com *B. abortus*. Esplenócitos foram cultivados por 72 horas na presença do mitógeno Concanavalina A (5µg/ml). Ao término do período de incubação as células foram incubadas com 5mg/ml de MTT por mais 4 horas. Os cristais de MTT foram então diluídos em DMSO e a leitura realizada em espectrofotômetro. O índice de proliferação foi calculado com base na metabolização do MTT de células estimuladas e não estimuladas. **NI**-Grupo não infectado; **INF**-Grupo infectado com *B. abortus*; **TRAT +INF**-Grupo tratado e infectado com *B. abortus*. (*) significativo em relação ao grupo NI, (#) significativo em relação ao grupo INF. $p < 0,05$.

5.4 Análise do percentual das células regulatórias após tratamento com Talidomida

Diversos patógenos utilizam as mais variadas estratégias para manipular os mecanismos regulatórios do sistema imune e assim assegurar a sua sobrevivência. Uma destas estratégias envolve a indução de respostas regulatórias que são normalmente associadas com o término das respostas imunes normais do hospedeiro (BELKAID, 2007). Em relação a *Brucella*, diferentes trabalhos já mostraram que este patógeno é capaz de induzir mecanismos de imunossupressão associados a presença de células T regulatórias (SPERA *et al.*, 2006; Pasquali *et al.*, 2010). Assim, uma vez que a Talidomida foi capaz de reverter a perda da responsividade de linfócitos induzida pela bactéria, avaliamos se este fármaco é capaz de modificar a população de células T regulatórias induzida pela infecção com *B. abortus*. Para isso, o número e percentual de células T CD4FoxP3⁺ e CD8FoxP3⁺ foi determinado no baço de animais infectados e tratados com Talidomida.

Conforme evidenciado na **Figura 9**, a infecção por *Brucella* induziu um aumento considerável no número e percentual de linfócitos T CD4⁺ com perfil regulatório (expressando o fator de transcrição FoxP3). Além disso, de forma interessante, também encontramos um significativo aumento na população de células T CD8FoxP3⁺ em animais infectados com *B. abortus*. Estes resultados demonstram que a bactéria é capaz de induzir um perfil regulatório composto tanto por células T CD4⁺ quanto T CD8⁺.

Entretanto, de maneira ainda mais surpreendente, o tratamento com Talidomida foi capaz de induzir uma redução significativa na população de células regulatórias de ambos os tipos (CD4 e CD8), retornando a níveis semelhantes aos dos animais que não foram infectados com o patógeno. Assim, embora mais estudos sejam necessários, estes resultados sugerem que o aumento na proliferação celular e na produção de citocinas inflamatórias (Queiroz, 2012) encontrados em animais tratados com Talidomida pode ser uma consequência da redução na população de células T regulatórias.

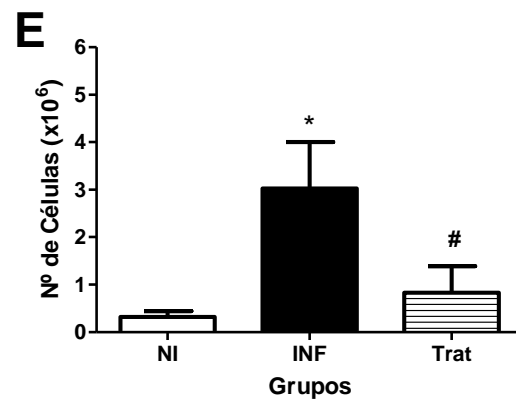
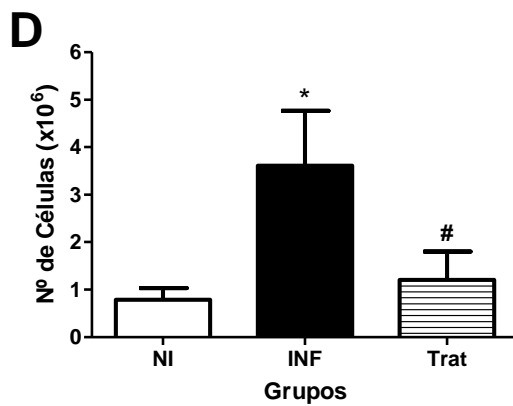
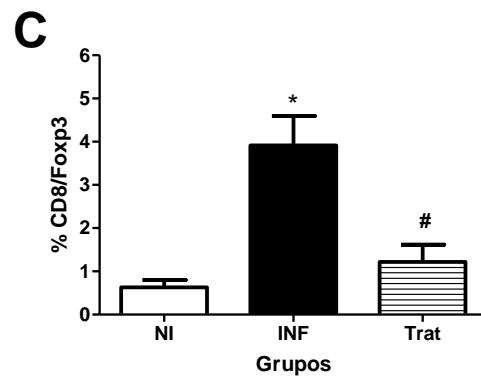
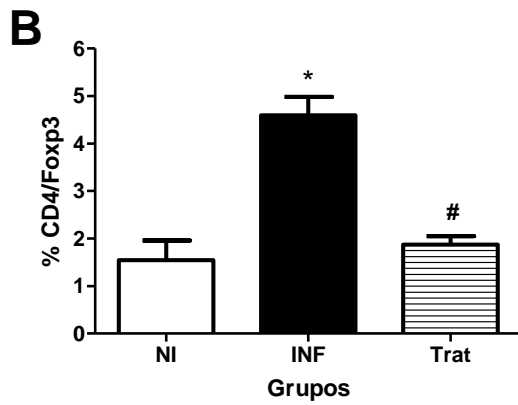
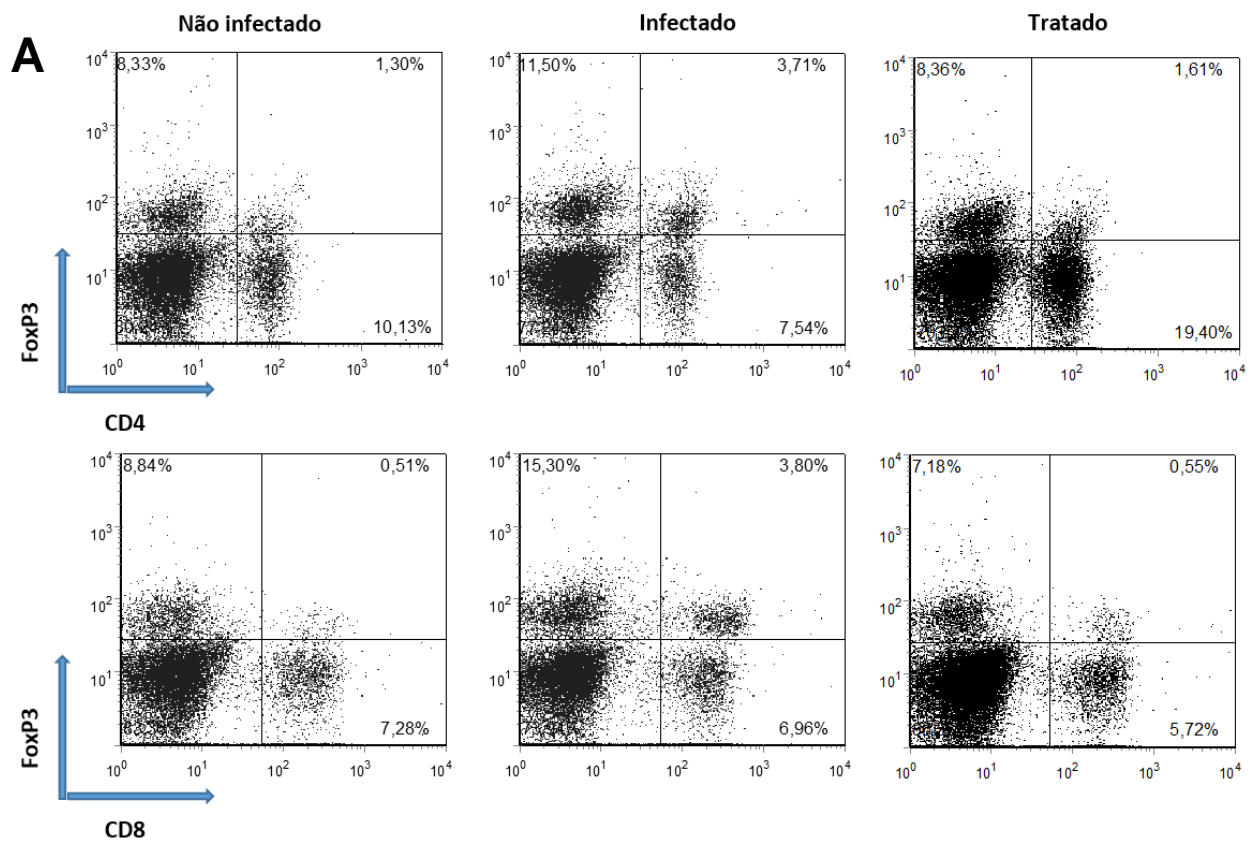


Figura 9: Percentual e número de células regulatórias CD4+FoxP3+ e CD8+FoxP3+ no baço. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com Talidomida (150mg/Kg/dia), infectados com *B. abortus* S2308 (10^6 bact/animal) e sacrificados após uma semana de infecção. Esplenócitos destes animais foram então retirados e marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-FoxP3 ou anti-CD8 e anti-FoxP3. (A) Dot-plots representativos de um experimento com 4 animais. (B e D) representação gráfica do percentual e número de células T CD4⁺FoxP3⁺. (C e E) representação gráfica do percentual e número de células CD8⁺FoxP3⁺. (*) $p < 0.05$, em relação ao grupo não infectado. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado.

5.5 Análise da sobrevivência de animais deficientes da citocina IFN- γ tratados com Talidomida e infectados com *Brucella abortus*.

Resistência a patógenos intracelulares facultativos como a *Brucella* depende basicamente da resposta celular adquirida caracterizada pela ativação de linfócitos T e subsequente ativação e aumento do poder bactericida de macrófagos. Interferon-gama é uma citocina diretamente envolvida neste processo e de fundamental importância no controle da Brucelose murina (KO *et al.*, 2002). A importância crucial desta citocina em resposta a *Brucella* tem sido evidenciada por diversos trabalhos nos quais animais knockouts para IFN- γ morrem após a infecção com a cepa virulenta S2308 da *Brucella abortus* (BRANDÃO *et al.*, 2011; MURPHY *et al.*, 2001). Assim, uma vez que a Talidomida é capaz de potencializar a resposta imune contra a *Brucella*, além de induzir uma maior produção de Óxido Nítrico por macrófagos, a capacidade deste fármaco em aumentar a sobrevivência de animais deficientes para IFN- γ foi avaliada. Para isso, camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ foram tratados com Talidomida e infectados com *B. abortus* S2308. Como controles foram utilizados camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ não tratados e camundongos C57BL/6 tratados ou não.

Conforme demonstrado na **Figura 10**, todos os animais deficientes para IFN- γ sucumbiram a infecção por *Brucella* em até 42 dias. Entretanto, embora a Talidomida seja capaz de reduzir a carga bacteriana, o tratamento não foi capaz de modificar significativamente a susceptibilidade destes animais que morreram em até 48 dias. Estes achados demonstram que a potencialização da eliminação bacteriana induzido pela Talidomida depende basicamente da produção da citocina IFN- γ .

Em contraste ao ocorrido com os animais knockout, no dia 50 após a infecção, quando o experimento foi interrompido, todos os animais C57BL/6, tratados ou não, ainda permaneciam vivos.

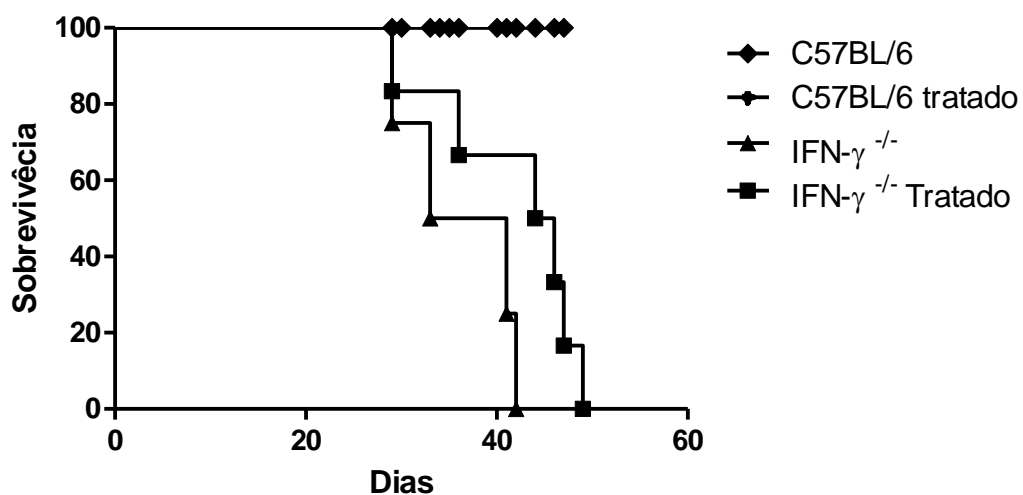


Figura 10: Avaliação da sobrevivência de animais IFN- γ ^{-/-} tratados com talidomida e infectados com *B. abortus*. Camundongos C57BL/6 e IFN- γ ^{-/-} foram tratados com Talidomida (150mg/Kg/dia) durante 7 dias e então infectados com *B. abortus* S2308 (1×10^6 bactérias/animal). Como controles foram utilizados animais C57BL/6 e IFN- γ ^{-/-} não tratados com Talidomida. O percentual de sobrevivência foi observado diariamente durante 50 dias

5.6 Avaliação da influência do tratamento com Talidomida na proteção induzida pela vacinação com a cepa vacinal RB51

A prevenção da brucelose humana, até o momento, depende da erradicação ou controle da doença no animal hospedeiro uma vez que não existem formas de imunização seguras para seres humanos. Dentre as diversas vacinas existentes, a administração de cepas vivas atenuadas, como a cepa rugosa RB51, tem sido a estratégia mais eficiente. Apesar disso, um problema inerente destas cepas é sua baixa persistência no hospedeiro, o que pode impedir o estabelecimento de uma imunidade protetora eficiente. Assim, muitos esforços têm sido focados na construção de vacinas mais eficazes ou de compostos que sejam capazes de potencializar as vacinas já existentes. Neste contexto, uma vez que a Talidomida tem demonstrado grande potencial em aumentar a eliminação da *Brucella abortus in vivo*, avaliamos se o tratamento com esta droga é capaz de melhorar a proteção induzida pela vacinação com a cepa RB51. Para isso, camundongos C57BL/6 foram tratados com Talidomida conforme descrito, vacinado com RB51 e, após seis semanas, desafiados com a cepa virulenta S2308. O número de UFC foi determinado após duas semanas de infecção.

Conforme esperado, a vacinação com a cepa RB51 foi capaz de diminuir significativamente o número de unidades formadoras de colônias recuperadas no baço. O mesmo ocorreu com animais tratados com Talidomida, onde a redução foi bem semelhante. Apesar disso, não foi percebido um efeito sinérgico entre o tratamento com Talidomida e a vacinação, demonstrando que a Talidomida não é capaz de aumentar a proteção conferida pela vacinação com a cepa rugosa RB51 (**Figura 11**).

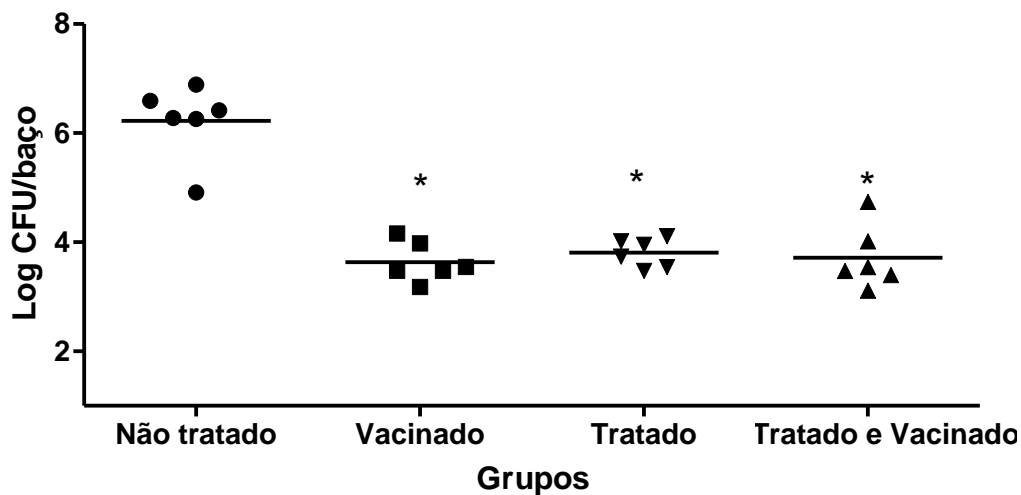


Figura 11: Influência do tratamento com Talidomida na proteção induzida pela vacinação. Camundongos C57BL/6 foram tratados com Talidomida (150mg/Kg/dia) durante 7 dias e vacinados com 10^8 bactérias da cepa RB51. Após seis semanas da vacinação, os animais foram desafiados com 10^6 bactérias da cepa S2308. O sacrifício ocorreu duas semanas após o desafio. Como controles foram usados animais não tratados e não vacinados, animais somente vacinados e animais somente tratados. (*) significativo em relação aos animais não tratados. $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Por ser considerada uma zoonose antiga e amplamente difundida em todo mundo, a Brucelose, causada pela *B. abortus*, é uma grave doença que representa uma importante causa de morbidade além de causar grandes prejuízos econômicos visto que está associada à infertilidade e aborto em animais. Embora o tratamento da brucelose seja eficiente, ainda não existem vacinas eficazes para a prevenção desta doença em humanos. Além disso, apesar dos grandes progressos obtidos no modelo murino, muitos mecanismos imunológicos induzidos pela *B. abortus* no hospedeiro ainda permanecem obscuros e necessitam ser desvendados.

Apesar das grandes lacunas ainda existentes, já está bem estabelecido que uma resposta T_H1 , com elevada produção de $IFN-\gamma$, bem como a ação de células T $CD8^+$ são extremamente importantes na eliminação deste patógeno (MURPHY *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1995; BRANDÃO *et al.*, 2012). Assim, uma vez que a Talidomida é capaz de induzir um perfil T_H1 e co-estimular células T $CD8^+$, aumentando sua proliferação (HASLETT *et al.*, 1998), Queiroz (2012) avaliou se o tratamento com Talidomida seria capaz de potencializar a resposta imune contra a infecção com *B. abortus*. Estes estudos de nosso grupo demonstraram que o tratamento prévio com Talidomida na concentração de 150mg/Kg/dia é capaz de aumentar a eliminação do patógeno, diminuindo o número de bactérias no baço e aumentando a produção de $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e IL-12, típicas de um perfil T_H1 . Além disso, este trabalho também evidenciou um maior percentual de células T $CD8^+$ associado ao aumento do potencial citotóxico em animais tratados. Com base nestes achados, o presente estudo visa determinar outros mecanismos imunológicos envolvidos neste aumento de resistência a *B. abortus* e que tenham sido modificados pelo tratamento com Talidomida.

Primeiramente, a influência da Talidomida no combate a *Brucella* foi confirmada através da determinação do número de bactérias recuperadas no baço de animais tratados. Conforme demonstrado na **Figura 6**, e em concordância com os resultados anteriores (QUEIROZ, 2012), o tratamento com Talidomida foi capaz de potencializar a resposta imune contra o

patógeno induzindo uma redução de aproximadamente 10 vezes na carga bacteriana presente no baço, após uma semana de infecção. Estes resultados demonstram claramente que a Talidomida é capaz de modular a resposta imune de forma a aumentar sua eficiência e conseqüentemente limitar a infecção por *B.abortus*.

É interessante ressaltar que, embora não tenha sido realizado nenhum experimento específico, as características da droga e a forma de tratamento utilizada aqui e nos estudos de Queiroz (2012) nos permitem inferir que a ação da Talidomida não ocorre diretamente sobre o patógeno. Esta proposição se baseia no fato de que o tratamento posterior à infecção não foi capaz de alterar a carga bacteriana esplênica (QUEIROZ, 2012). Além disso, nos protocolos de tratamento prévio utilizados neste estudo, o curto tempo de meia vida associado à Talidomida (cerca de 8 horas – bula Talidomida) assegura que a droga já se encontrava completamente metabolizada no momento da infecção com o patógeno. Assim, o provável mecanismo pelo qual o tratamento diminui a carga bacteriana é através da modulação do sistema imune.

Uma vez confirmada a ação da droga sobre a carga bacteriana, o próximo objetivo do estudo foi determinar se a Talidomida seria capaz de modificar mecanismos da resposta imune inata que atuam contra a infecção. Para isso, macrófagos peritoneais foram extraídos de camundongos C57BL/6, tratados com diferentes concentrações de Talidomida e então infectados com *B. abortus* ou estimulados com LPS. A escolha dos macrófagos como representantes da imunidade inata se baseou no fato de que estas células são consideradas os principais locais de sobrevivência e replicação da bactéria (SANGARI *et al.*, 1996) sendo também importantes na resistência do hospedeiro contra o patógeno (ARCHAMBAUD *et al.*, 2010).

Conforme esperado, houve uma significativa diminuição na produção de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6 e NO) em macrófagos tratados com Talidomida e estimulados com LPS. Estes achados estão de acordo com os estudos de Nomam e colaboradores (2009 a,b) os quais também evidenciaram uma diminuição na produção de TNF- α e óxido nítrico em macrófagos tratados com Talidomida e estimulados com LPS. Além disso, estes resultados confirmam o caráter anti-inflamatório típico da Talidomida.

Apesar desta diminuição na produção de citocinas e óxido nítrico em resposta ao LPS, a Talidomida não foi capaz de diminuir a produção destes mediadores quando os mesmos foram estimulados com *B. abortus* (**Figura 7**). Além disso, de forma surpreendente, a análise da concentração de óxido nítrico revelou um significativo aumento na produção deste composto em células tratadas com a droga. Estes resultados sugerem que o estímulo com *Brucella* poderia ser suficientemente forte para induzir a produção destes mediadores apesar da ação da Talidomida. Outra hipótese seria que a produção de citocinas e, principalmente de óxido nítrico, ocorreria através de vias diferenciadas que não são afetadas pela ação da Talidomida. De fato, nos estudos de Nomam e colaboradores (2009-b) também foram encontrados estímulos que induziam a produção de NO mesmo após o tratamento com Talidomida. Estes autores sugerem que a ação da Talidomida ocorra sobre a molécula MyD88 (adaptador comum na via de sinalização da maioria dos receptores do tipo Toll) e que esta produção de Óxido Nítrico seja realizada de maneira MyD88 independente.

Apesar da necessidade de mais estudos para confirmar as hipóteses acima, nossos resultados nos permitem sugerir que o Óxido Nítrico é um possível favorecedor da eliminação do patógeno em animais tratados com Talidomida.

Uma interessante propriedade da Talidomida é a indução de proliferação celular que ocorre principalmente em linfócitos T CD8⁺. Haslett e colaboradores (1998) demonstraram que esta droga é capaz de agir sobre linfócitos estimulando sua proliferação de forma dependente da citocina IL-2. Em contrapartida, diferentes trabalhos demonstraram que a infecção por *B. abortus* é capaz de induzir imunossupressão evidenciada principalmente pela ausência de proliferação de linfócitos T em resposta a mitógenos, como a Concanavalina A. Esta ausência de proliferação pode funcionar como um mecanismo de escape do sistema imune utilizado pelo patógeno para favorecer sua sobrevivência (SPERA *et al.*, 2006; RODRIGUES-ZAPATA *et al.*, 1996). Para determinar se a Talidomida é capaz de alterar este mecanismo de escape induzido pela *Brucella*, avaliamos o índice de proliferação celular de esplenócitos provenientes de animais tratados ou não com Talidomida e estimulados com Concanavalina A. Em concordância com

os trabalhos prévios, esplenócitos de animais infectados apresentaram menor índice de proliferação celular quando comparados aos esplenócitos de animais não infectados (**Figura 8**). Entretanto, o tratamento prévio com Talidomida, demonstrou reverter de forma parcial esta imunossupressão induzida pela bactéria, aumentando a proliferação celular após a infecção. Essa maior proliferação de linfócitos encontrada neste trabalho provavelmente contribuiu para a melhor eliminação do patógeno e pode explicar o aumento no percentual de células T CD8⁺ e a maior produção de IFN- γ encontrados nos estudos de Queiroz e colaboradores (2012).

Diversos estudos têm demonstrado a importância das células regulatórias na modulação do sistema imune induzida por diversos tipos de patógenos. Neste contexto, estas células poderiam atuar diminuindo a proliferação celular, produzindo citocinas imunossupressoras (como a IL-10 e TGF- β) ou ainda induzindo a apoptose de células efetoras, favorecendo assim a cronicidade das infecções (HISAEDA *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005; WALTHER *et al.*, 2005). Em modelos de infecção por *Brucella*, já foi demonstrado que a bactéria é capaz de evitar a ativação de macrófagos por induzir células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺) a produzirem a citocina IL-10. A depleção destas células T regulatórias foi capaz de aumentar a resistência ao patógeno, o que ficou evidente pelo menor número de bactérias recuperadas no baço destes animais (PASQUALI *et al.*, 2010). Assim, uma vez que as células regulatórias parecem ser importantes para a sobrevivência do patógeno, avaliamos a ação da Talidomida sobre este tipo de células. De forma interessante foi encontrado um significativo aumento no número e percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ com perfil regulatório (expressando o fator de transcrição FoxP3), após a infecção com o patógeno. Entretanto, de maneira surpreendente, o tratamento com Talidomida foi capaz de diminuir significativamente o número destas células (CD4FoxP3⁺ e CD8FoxP3⁺).

A diminuição na população de células T regulatórias pelo tratamento com Talidomida também foi encontrada nos estudos de Yang e colaboradores (2008). Estes pesquisadores relataram que pacientes com Mieloma múltiplo apresentam um aumento na população de células T CD4 regulatórias e que esta população encontrava-se reduzida naqueles

submetidos ao tratamento com Talidomida. Além disso, trabalhos recentes realizados por Skorcka e colaboradores (2014), evidenciaram que a Talidomida é capaz de agir diferencialmente sobre o fator de transcrição NF- κ B diminuindo a atividade de células regulatórias. Assim, acreditamos que o aumento na produção de citocinas inflamatórias percebida por Queiroz (2012), aliado ao aumento na proliferação celular encontrada aqui, podem ser consequências da alteração na população de células regulatórias induzida pelo tratamento com Talidomida. Entretanto, apesar destes importantes achados, outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese, bem como para determinar as formas de ação destas células T regulatórias.

O IFN- γ é uma citocina crítica para o controle da infecção por *Brucella* no hospedeiro (MURPHY *et al.*, 2001). A importância do IFN- γ no controle da *Brucella* foi mostrada pela primeira vez, *in vivo*, por Zhan e colaboradores (1993) que usaram anticorpos monoclonais capazes de depletar ou neutralizar a ação desta citocina em camundongos, o que resultou em uma expressiva exacerbação da infecção. O papel crucial desta citocina foi definitivamente confirmado através da utilização de camundongos “Knockouts” (IFN- $\gamma^{-/-}$) para IFN- γ . Estes animais não são capazes de combater eficientemente a bactéria e acabam sucumbindo à infecção (BANDÃO *et al.*, 2011; MURPHY *et al.*, 2001). Em nosso estudo, utilizamos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ para avaliar se o tratamento prévio com Talidomida, seria capaz de aumentar a sobrevivência desses animais visto que o fármaco potencializa a resposta imune contra a *Brucella*, além de induzir uma maior produção de Óxido Nítrico por macrófagos. Embora em camundongos normais a Talidomida aumente a eliminação da bactéria, o mesmo não correu em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ que morreram entre os dias 42 e 48 pós infecção, se igualando aqueles que não receberam tratamento (**Figura 10**). Sendo assim, é possível sugerir que as ações da Talidomida para potencializar a eliminação da *Brucella* sejam dependentes da citocina IFN- γ .

A vacinação é uma das medidas mais eficazes na redução da prevalência e incidência da brucelose e tem contribuído enormemente para o sucesso de muitos programas, especialmente na fase de controle da doença. A vacinação animal é considerada um dos métodos mais práticos e eficazes

na redução da doença já que, até o momento, não existem formas eficazes de imunização em humanos, como cita Moriyón e colaboradores (2004). Atualmente, apenas três vacinas vivas atenuadas são recomendadas para o controle da infecção por *B. abortus* em bovinos: *B. abortus* 45/20, *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51 e todas elas apresentam importantes limitações (AVILA-CALDERON *et al.*, 2013). No presente estudo, a cepa RB51 foi utilizada para determinar se o tratamento prévio com Talidomida seria capaz de influenciar na proteção induzida por essa cepa vacinal. Os resultados demonstraram que, apesar do potencial da Talidomida em estimular o sistema imune, não foi encontrada diferença na proteção induzida pela vacinação em animais tratados ou não com Talidomida (**Figura 11**). Este fato pode estar relacionado ao uma baixa persistência da cepa RB51 no interior do organismo hospedeiro, uma vez que a Talidomida aumentou a proliferação celular e diminuiu a população de células regulatórias.

Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho sugerem uma nova aplicabilidade para a Talidomida já que, suas ações sobre o sistema imune foram capazes de potencializar a eliminação da bactéria *B. abortus in vivo*. Essa ação da Talidomida parece estar relacionada a diminuição da imunossupressão induzida pelo patógeno (diminuição de células regulatórias e aumento da proliferação celular) bem como aumento da produção de mediadores inflamatórios como o Óxido Nítrico. Além disso, o aumento da resistência a *Brucella* induzido pela Talidomida mostrou-se dependente da citocina IFN- γ .

É importante ressaltar que nosso foco não é sugerir o tratamento de infecções por *Brucella* com a droga Talidomida. A conhecida teratogenicidade e neuro-toxicidade apresentada por esta droga em conjunto com sua curta meia vida impõem sérias restrições ao seu uso em humanos e animais. Entretanto, nosso estudo sugere, de forma fundamentada, o uso de compostos semelhantes a Talidomida (Análogos) que consigam manter suas habilidades co-estimulatórias, mas subvertam as ações tóxicas deste composto.

7 CONCLUSÕES

- A talidomida é capaz de potencializar a eliminação da bactéria *Brucella abortus in vivo*, de forma dependente da citocina IFN- γ .
- A menor susceptibilidade de animais tratados com Talidomida provavelmente está relacionada a maior produção de Óxido Nítrico por macrófagos e a diminuição da imunossupressão induzida por este patógeno.
- Embora a Talidomida seja eficiente em aumentar a eliminação da *Brucella*, sua ação não é capaz de potencializar a proteção induzida pela vacinação com a cepa RB51.

8 REFERÊNCIAS

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

ARCHAMBAUD, C.; SALCEDO, S. P.; LELOUARD, H.; *et al.*, Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection, **European Journal of Immunology**, vol. 40, no. 12, pp. 3458–3471, 2010.

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

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

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

ARAYA, L.M.; ELZER, P.H.; ROWE, G.R.; ENRIGHT, R.M.; WINTER, A.J. 1989. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. **The Journal of Immunology**, 143:3330-3337.

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

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

BARRIONUEVO, P.; CASSATARO, J.; DELPINO, M.V.; ZWERDLING, A.; PASQUEVICH, K.A.; SAMARTINO, C.G.; WALLACH, J.C.; FOSSATI, C.A.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. *Brucella abortus* Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen Processing through Interleukin-6 Secretion via Toll-Like Receptor 2. **Infection and Immunity**, v.76, p.250-262, 2008.

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

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

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

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

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

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

CAPASSO, L.; Bactéria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **J. Infect.**, v.45, p.122-127, 2002.

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

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

CRASTA, O. R. et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. **PLoS One**, v. 3, n. 5, p. e2193, 2008.

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

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

CHRISTOPHER, S.; UMAPATHY, B. L.; RAVIKUMAR, K. L. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. **J Lab Physicians**, v. 2, n. 2, p. 55-60, Jul 2010.

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

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

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

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

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I: *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas fetus*. **Vet. Bull.**, v. 62, p. 743-775, 1992.

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

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

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

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

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

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

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

FRANCO, M. P. et al. Human brucellosis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 12, p. 775-86, Dec 2007.

GEITZ, H.; HANDT, S.; ZWINGENBERGER, K. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. **Immunopharmacology**, v. 31, n. 2-3, p. 213-21, Mar 1996.

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

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

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

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

HASLETT, P. A. et al. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. **J Exp Med**, v. 187, n. 11, p. 1885-92, Jun 1 1998.

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

HUANG, L.Y. et al. TH1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3964-3970, 2005.

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

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

JIANG, X., LEONAR, B., BENSO, r., BALDWIN, C.L. Macrophage Control of *Brucella abortus*: Role of Reactive Oxygen intermediates and Nitric Oxide. **Cellular Immunology**, v.151, p. 309-319, 1993.

KATARZINA, S.; BHATTACHARYA, N.; WLASIUK, P.; KOWAL, M.; MERTENS, D.; DMOSZYNSKA,A.; GIANNOPOULOS, K. Thalidomide Regulation of NF- κ B Proteins Limits Tregs Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Adv Clin Exp Med**, v. 23, p. 25-32, 2014.

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

LAGIER, J.C.; RAOULT, D. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with bacterial infections. **Expert Opin Drug Saf**, v.13, p 341-350; 2014.

LAPAQUE, N., MORIYON, I. , MORENO, E., et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.8, p. 60-66, 2005.

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

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

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

MARTIROSYAN, A.; GORVEL, J. P. *Brucella* evasion of adaptive immunity. **Future Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 147-54, Feb 2013.

MANTUR, B.G.; AMARNATH, S.K.; SHINDE, R.S.. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 25, p. 188– 02, 2007.

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

MELCHERT, M.; LIST, A. The thalidomide saga. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 7-8, p. 1489-99, 2007.

MITSIADES, N. et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4525-30, Jun 15 2002.

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

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

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

NICOLETTI, P. A. A short history of brucellosis. **Vet. Microbiol.**, v.90, p.5-9, 2002.

NOMAN, A. S. et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production via down-regulation of MyD88 expression. **Innate Immun**, v. 15, n. 1, p. 33-41, Feb 2009.

OLIVEIRA, S.C.; SPLITTER, G.A. 1995. CD8+ type 1 CD44hi CD45Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 2551–2557, 1995.

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

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

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

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

PASQUALI, P.; THORNTON, A.M.; VENDETTI, S.; PISTOIA, C.; PETRUCCI, P.; TARANTINO, M.; PESCIAROLI, M.; RUGGERI, F.; BATTISTONI, A.; SHEVACH, E.M.. CD4+CD25+ T regulatory cells limit effector T cells and factor the progression of brucellosis in BALB/c mice. **Microbes and infection**, v. 12, p.3-10, 2010.

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

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

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V.S. P. and LAGE, A. P. 2002. **Brucellosis in Brasil. Veterinary microbiology**. **90**, p 55-62.

QUEIROZ, N.C. Efeito do tratamento com Talidomida na resposta imune contra a bactéria *Brucella abortus*. 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Doenças Infecto parasitárias). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

RANDALL, T. Thalidomide has 37-year history. **Jama**, v. 263, n. 11, p. 1474, Mar 16 1990.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 95-101, Apr 1993.

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

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

SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 479-96, Dec 20 2002.

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

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

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

SPERA, J.M.; UGALDE, J.E.; MUCCI, J.; COMERCI, D.J.; UGALDE, R.A.. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 16514-16519, 2006.

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

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

TAYLOR, M.D.; LEGOFF, L.; HARRIS, A.; MALONE, E.; ALLEN, J.E.; MAIZELS, R.M. 2005. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 4924-4933, 2005.

THOEN, C. O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N. F. *Brucella*. In: GYLES, C. L. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2. ed. **Ames: Iowa State University Press**, p. 236-247, 1993.

TSENG, S. et al. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. **J Am Acad Dermatol**, v. 35, n. 6, p. 969-79, Dec 1996.

TSOLIS, R.M. Comparative genome analysis of the alpha-proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.20, p.12503-12505, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.212508599>>. Acesso em: 12 jun 2013.

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

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

XAVIER, M. N. et al. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **J Comp Pathol**, v. 140, n. 2-3, p. 149-57, 2009.

WALTHER, M.; TONGREN JE.; ANDREWS, L.; KORBEL, D.; KING, E.; FLETCHER, H.; ANDERSEN, R.F.; BEJON, P.; THOMPSON, F.; DUNACHIE, S.J.; EDELE, F.; DE SOUZA, J.B.; SINDEN, R.E.; GILBERT, S.C.; RILEY, E.M.; HILL, A. V.. Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. **Immunity**, v. 23, p. 287-296, 2005.

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

WINTER, A.J.; DUNCAN, J.R.; SANTISTEBAN, C.G.; DOUGLAS, J.T., ADAMS, L.G. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *B. abortus* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 3438-3444, 1989.

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

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

ZAPATA, M.R.; ALVAREZ MON, M.; MANZANO, L.; SALMERON, I.; PRIETO, A.; SALMERON, O.J.; CARBALLIDO, J. Diminished T lymphocyte proliferative response to polyclonal mitogens in acute brucellosis patients. **Infection**, v.24, p. 115-120, 1996.

ZHAN, Y.; CHEERS, C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4899-4901, 1993.

YANG, Y.; ZHANG, W.G.; HE, A.L.; YANG, H.Y.; WANG, J.L.; TIAN, W. Effects of thalidomide on CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells in patients with myeloma. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 16, p. 538-542, 2008.

